HYDRODYNAMISCHE UND ^{31}P-KERNRESONANZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AM HERZMUSKEL-PHOSPHOTROPONIN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
NORBERT BEIER
aus Hagen

1983

UNIV.
LIBRARY
NOTL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0045

HYDRODYNAMISCHE UND ^{31}P-KERNRESONANZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AM HERZMUSKEL-PHOSPHOTROPONIN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
NORBERT BEIER
aus Hagen

1983

Referent: Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer jr.

Korreferent: Prof. Dr. O. Pongs

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. W. Kutzelnigg

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.1983

Meinen Eltern

Vorveröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist an folgenden Stellen veröffentlicht worden:

Beier, N., Schnackerz, K.D. und Heilmeyer, L.M.G., jr., (1982) J. Muscle Res. Cell Motil. 3, 118

Beier, N., Schnackerz, K.D. und Heilmeyer, L.M.G., jr., (1982) J. Muscle Res. Cell Motil. 3, 472

Danksagung

Für ihren Anteil an der Entstehung dieser Arbeit danke ich besonders

Herrn Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und sein stetes und förderndes Interesse,

Herrn Prof. Dr. O. Pongs für die Übernahme des Korreferates,

Frau Dr. M. Varsányi für die Gabe von Phosphorylase Kinase,

Herrn Priv. Doz. Dr. K.D. Schnackerz, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Würzburg, für die Aufnahme der ^{31}P-NMR-Spektren mit dem WH-180-Spektrometer und seine nicht ermüdende Unterstützung dabei,

Herrn Dr. W. Gombler und Herrn F. Behle, Lehrstuhl für Anorganische Chemie II der Ruhr-Universität, für die Aufnahme der ^{31}P-NMR-Spektren mit dem WH-250-Spektrometer,

Frau Dr. U. Jahnke für die Hilfe bei der Benutzung der Computerprogramme,

Herrn Dr. G. Mayr für die Anleitung und die Möglichkeit, das IEF-Gerät zu benutzen, und manche hilfreiche Diskussion,

Herrn H. Korte für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugationsläufe,

Frau A. Mannhardt für ihre qualifizierte Mitarbeit bei der Reinschrift dieser Arbeit

und allen Mitarbeitern unseres Hauses, die durch ihre Unterstützung an der Entstehung dieser Arbeit mitwirkten.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Abkürzungen

Neben den von der IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature (veröffentlicht in Eur. J. Biochem. 1, 259) empfohlenen wurden folgende Abkürzungen ohne weitere Erläuterung verwendet:

cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
cmp	gezählte radioaktive Impulse pro Minute
DTE	1,4,-Dithioerythrit
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(ß-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
IEF	isoelektrische Fokussierung
$K_{Mg^{2+},Ca^{2+}}$	Assoziationskonstante
LB	Linienverbreiterung
ME	2-Mercaptoethanol
P	Phosphat
pCa	negativer Logarithmus der Ca^{2+}-Ionen-Konzentration
pK_s	negativer Logarithmus der Säure-Dissoziationskonstanten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tn	Troponin
TnT	Tropomyosin-bindende Untereinheit des Troponins
TnI	Inhibitorische Untereinheit des Troponins
TnC	Ca^{2+}-bindende Untereinheit des Troponins
U	Einheit der enzymatischen Aktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methoden	11
2.1.	Präparative Methoden	11
2.1.1.	Präparation des Troponins aus Rinderherzmuskel	11
2.1.2.	Auftrennung des Troponinkomplexes in seine Untereinheiten	13
2.1.3.	Präparation des Herzmuskel-Tropomyosins	14
2.1.4.	Anreicherung endogenen Phosphatase-Aktivitäten (a) Mn^{2+}-stimulierbare, alkalische Phosphatase-Aktivität (b) Saure Phosphatase-Aktivität	15
2.1.5.	Präparation der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase	17
2.1.6.	Bestimmung des proteingebundenen Phosphatgehaltes des Troponins und seiner Untereinheiten	17
2.1.7.	Dephosphorylierung des Herzmuskel-Troponinkomplexes	18
2.1.7.1.	Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm	18
2.1.7.2.	Inkubation mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln	19
2.1.7.3.	Inkubation mit den Phosphatase-Aktivitäten der Herzmuskel-Troponinpräparation (a) Inkubation mit der alkalischen Phosphatase-Aktivität (b) Inkubation mit der sauren Phosphatase-Aktivität	19
2.1.8.	Phosphorylierung des Herzmuskel-Troponin	20

		Seite
2.1.8.1.	Phosphorylierung mit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase (a) Analytischer Ansatz (b) Präparativer Ansatz	20
2.1.8.2.	Phosphorylierung mit der Ca^{2+}-abhängigen Phosphorylase-Kinase	21
2.2	Analytische Methoden	22
2.2.1.	Bestimmung der Phosphatase-Aktivitäten (a) Test auf alkalische Phosphatase-Aktivität (b) Test auf saure Phosphatase-Aktivität (c) Test auf Zn^{2+}/Mg^{2+}-abhängige alkalische Phosphatase-Aktivität	22
2.2.2.	Stabilitätstest der Troponinproben auf proteolytische Aktivität	23
2.2.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.2.3.1.	Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS	24
2.2.3.2.	Quantitative Auswertung der SDS-Elektrophorese-Gele	24
2.2.3.3.	Isoelektrische Fokussierung nach der NEPHGE-Methode	25
2.2.4.	Zentrifugationsläufe mit der analytischen Ultrazentrifuge	26
2.2.4.1.	Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten	26
2.2.4.2.	Auswertung der Sedimentationsläufe	27
2.2.4.3.	Gleichgewichtsläufe	28
2.2.4.4.	Auswertung der Gleichgewichtsläufe	28
2.2.5.	Angaben zur Bestimmung der Viskosität der Troponinproben	29
2.2.6.	Eichung einer Sephacryl S 300 Säule (1.5/83) für die Bestimmung des Stokesschen Radius des Troponins	30
2.2.7.	Angaben zur Aufnahme der ^{31}P-NMR-Spektren (a) Aufnahme der NMR-Spektren mit dem Bruker WH-180-Spektrometer bei 72.86 mHz	31

		Seite
	(b) Aufnahme der NMR-Spektren mit dem Bruker WH-250-Spektrometer bei 101.257 MHz	
2.2.8.	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.2.9.	Angaben zur Radioaktivitätsmessung	32
2.2.10.	Bestimmung des ^{32}P-Phosphateinbaus in Proteine	33
2.2.11.	Lokalisation des ^{32}P-Phosphateinbaus in den phosphorylierten Proteinen	33
2.2.12.	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Troponins	34
2.2.13.	Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Diskussion der Veränderungen des Präparationsverfahrens	36
3.2.	Präparation des Tropomyosins unter phosphataseinhibierenden Bedingungen	44
3.3.	Auftrennung des Herzmuskel-Troponins in seine Untereinheiten	44
3.4.	Aminosäureanalyse des Troponins	48
3.5.	Phosphoprotein Troponin	50
3.5.1.	Der proteingebundene Phosphatgehalt des Troponins in Abhängigkeit von der Präparationsmethode	50
3.5.2.	Beeinflussung des proteingebundenen Phosphatgehaltes	54
3.5.2.1.	Inkubation mit Phosphatasen	54
3.5.2.1.1.	Inkubation mit den endogenen Phosphatase-Aktivitäten	55
3.5.2.1.2.	Inkubation mit exogenen Phosphatasen	57
3.5.2.2.	Phosphorylierung mit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase	59
3.5.2.3.	Phosphorylierung mit der Ca^{2+}-abhängigen Phosphorylase-Kinase	62

		Seite
3.5.3.	Analyse der Phosphatverteilung im Troponinkomplex mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung	65
3.6.	Stöchiometrie des Troponinkomplexes; Färbefaktoren der Untereinheiten und Intensitätsverteilung für die Untereinheiten im Holotroponin	70
3.7.	Hydrodynamische Untersuchungen am Herzmuskel-Phosphotroponin	72
3.7.1.	Zentrifugationsläufe mit der analytischen Ultrazentrifuge	72
3.7.1.1.	Bestimmung der Sedimentationskonstanten $s^o_{20,W}$	72
3.7.1.2.	Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen	78
3.7.2.	Bestimmung der intrinsischen Viskosität	78
3.7.3.	Bestimmung des Stokesschen Radius aus Gelfiltrationsläufen	81
3.7.4.	Berechnung der hydrodynamischen Parameter	84
3.7.4.1.	Verknüpfung der Meßwerte mit den hydrodynamischen Parametern	86
3.7.4.2.	Bestimmung des Quotienten der Translationsreibungskoeffizienten f/f_m	89
3.7.4.3.	Bestimmung des Simha-Faktors ν_a	90
3.7.4.4.	Bestimmung des ß-Faktors nach der Scheraga-Mandelkern-Gleichung	91
3.8.	Entwicklung eines Ellipsoidmodells, welches das hydrodynamische Verhalten des Troponins in Lösung beschreibt	92
3.9.	^{31}P-kernresonanzspektroskopische Untersuchungen am Phosphotroponinkomplex	96
3.9.1.	Identifizierung der Phosphorkernresonanzsignale	96
3.9.2.	^{31}P-NMR-Spektren des Herzmuskel-Troponins: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ^{31}P-NMR-Signale vom Metall(II)ionen-Komplexzustand des Troponins	98

		Seite
3.9.3.	^{31}P-NMR-Spektren eines Troponinkomplexes, der durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm an der TnT-Untereinheit dephosphoryliert wurde	103
3.9.4.	^{31}P-NMR-Spektren eines Troponinkomplexes in Abhängigkeit von der Ca^{2+}-Ionen-Konzentration	107
3.9.5.	pH-Abhängigkeit der ^{31}P-NMR-Signale des Herzmuskel-Troponins	110
3.9.6.	Auswertung der NMR-Daten	115
3.9.6.1.	Identifizierung der Phosphorresonanzsignale	115
3.9.6.2.	Bestimmung der allgemeinen Korrelationszeit τ_c der untersuchten Phosphorkerne	116
3.9.6.3.	Zuordnung der ^{31}P-NMR-Signale zu Phosphorylierungsseiten des Troponins	118
4.	Diskussion	125
4.1.	Vergleich mit bislang veröffentlichten Präparationsverfahren	125
4.2.	Proteingebundener Phosphatgehalt und Phosphorylierungsverhalten des Herzmuskel-Troponins	130
4.3.	Zuordnung der endogenen Phosphatase-Aktivitäten	134
4.4.	Stöchiometrische Zusammensetzung des Herzmuskel-Troponins	136
4.5.	Hydrodynamische Eigenschaften des Herzmuskel-Troponins	138
4.6.	^{31}P-kernresonanzspektroskopische Untersuchungen des Phosphotroponins	142
5.	Zusammenfassung	152
6.	Literatur	154

1. Einleitung

Viele metabolische Prozesse werden in Eukaryontenzellen durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung beteiligter Schlüsselenzyme reguliert. In der Muskelzelle sind die Regulation der Glykolyse, der Glykogenolyse bzw. der Glykogensynthese durch Phosphorylierung der entsprechenden Enzyme, wie z.B. der Phosphorylase, Glykogen-Synthase, Phosphofructo-Kinase, und anderer mehr gut untersuchte Beispiele dafür (Krebs und Beavo, 1979). Auch in der Kontrolle der DNA-Transkription und -Replikation durch Histon-Phosphorylierung (Isenberg, 1979) oder bei viraler Transformation (Hayman, 1981) stellt diese kovalente Modifikation einen bedeutenden Regulationsmechanismus dar.
Fast alle am Aufbau des kontraktilen Apparates beteiligten Strukturproteine sind ebenfalls Phosphoproteine. Man hat deshalb vermutet, daß die Kontraktion neben der Ca^{2+}-Abhängigkeit ebenfalls durch Phosphorylierungs- sowie Dephosphorylierungsprozesse reguliert wird (Perry, 1979; Heilmeyer et al., 1980).
Der kontraktile Apparat besteht aus zwei funktionellen Grundelementen, den dicken und dünnen Filamenten. Durch eine hexagonale Anordnung dieser Stränge entsteht ein ineinander verschiebbares Gitter; die makroskopisch beobachtbare Verkürzung des Muskels ist, auf molekularer Ebene, durch ein Aneinandervorbei- und Ineinandergleiten dieser Filamente zu erklären. Die mit dem dünnen Filament verbundenen Z-Banden, durch die die funktionelle Grundeinheit des Muskels, das Sarkomer, begrenzt wird, bewegen sich dabei aufeinander zu und verringern ihren Abstand (Huxley, 1957; Huxley, 1972).
Das dicke Filament einer Muskelzelle (im quergestreiften wie im glatten Muskel) wird aus Myosin gebildet, das ein Dimer aus zwei fast identischen Untereinheiten ist (MG: 470000 D; Lowey et al., 1969). Strukturell ist das Myosin in zwei verschiedene Bereiche unterteilbar; zwei globuläre Kopfteile (MG: 120000 D) sind jeweils über flexibele Brückenbereiche mit dem langgestreckten, stabförmigen Schwanzteil (MG: 210000D) verbunden. Diese langgestreckten Strukturen sind a-helikal,

in den Dimeren winden sich die Monomere zu einer starren Helix umeinander. Jeder Kopfteil eines Myosinmonomeren enthält zwei verschiedene Arten kleinerer Untereinheiten (leichte Ketten; MG: 18-25000 D), denen eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird. An einer dieser leichten Ketten (P-leichte Kette) kann das Myosin durch eine spezifische Kinase (MLCK = Myosin Light Chain Kinase) phosphoryliert bzw. durch eine entsprechende Phosphatase dephosphoryliert werden (Perry, 1979).
Durch die Aneinanderlagerung der stabförmigen Schwanzteile einer Vielzahl von Myosin-Molekülen wird das 'Rückgrat' des dicken Filaments gebildet. Das bewegliche Verbindungsstück zwischen Kopf- und Schwanzteil ermöglicht eine Wechselwirkung des Kopfteils mit den Aktin-Molekülen im dünnen Filament. In diesen Kopfteilen ist das katalytische Zentrum, die ATPase, lokalisiert. Die bei dieser Interaktion erleichterte hydrolytische Spaltung des ATPs auf Grund der beschleunigten Dissoziation der Hydrolyseprodukte, die am Myosinkopf gebunden sind, liefert die für die Kontraktion notwendige Energie (Koretz und Taylor 1975; Chock et al., 1976). Durch eine konformationelle Veränderung der Myosinköpfe, einer Kippbewegung im Bezug zum dünnen Filament, werden die beiden Filamente aneinander vorbeigeführt (Huxley, 1969).
Das dünne Filament ist im Gegensatz zum dicken Filament aus drei verschiedenen Proteinen aufgebaut (Potter und Gergely, 1974). Das Grundgerüst wird aus zwei Ketten aneinandergereihter, globulärer Aktin-Monomerer gebildet, die umeinander gewunden sind. Auf beiden Seiten jedes Aktinstranges, in oder entlang der Furche, die von diesen beiden Molekülketten gebildet werden, liegt das zweite Protein, Tropomyosin. Es besteht ebenfalls aus zwei gleichen Untereinheiten. Dieses dünne (Durchmesser: $\sim$ 30 nm), langgestreckte Molekül (Länge: 450 nm) bedeckt jeweils 7 Aktinmoleküle. Durch eine Kopf-Schwanz-Polymerisation verlaufen zwei Tropomyosinstränge entlang dem dünnen Filament (Ebashi und Endo, 1968). Für das Skelettmuskel-Tropomyosin aus dem Frosch (Mak et al., 1978) und für das Herzmuskeltropomyosin des Rindes ist gezeigt worden, daß α-Tropomyosin in vivo ein Phosphoprotein ist, das

an einer spezifischen Seite (Serin-283), der vorletzten Aminosäure im α-Tropomyosin, phosphoryliert ist (Stull und Buss, 1977; Stull, 1980).

Im C-terminalen Drittel des Tropomyosin-Moleküls wird das dritte Protein, Troponin, gebunden (Ohtsuki, 1980; Flicker et al., 1982). Dieser heteromere Komplex ist aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgabaut. Die größte Untereinheit ist die Tropomyosin-bindende Untereinheit (TnT) (MG: 30-35000 D; Pearlstone et al., 1977; Burtnick et al., 1976), über die der Troponinkomplex an das Tropomyosin gebunden ist. Als nächst kleinere folgt die inhibitorische Untereinheit (TnI) (MG: 20 - 24000 D; Burtnick et al., 1975 a; Grand et al., 1976), die als isoliertes Protein die Aktomyosin-ATPase hemmt. In Gegenwart der dritten, der Ca^{2+}-bindenden Untereinheit (TnC) (MG: 18 - 18500 D; Collins et al., 1973; van Eerd und Takahashi, 1976), wird die inhibitorische TnI-Wirkung Ca^{2+}-sensitiv (Ebashi und Endo, 1968; Hincke et al., 1977). Durch die Wechselwirkung mit der Ca^{2+}-beladenen TnC-Untereinheit wird die Hemmung der Aktomyosin-ATPase aufgehoben. Dissoziation der Ca^{2+}-Ionen von der TnC-Untereinheit führt wieder zur Hemmung der ATPase. Nach Holroyde et al. (1980) bindet der Herzmuskel-Troponinkomplex 3 Mol Ca^{2+}, in Übereinstimmung mit der Vorhersage aus der Aminosäuresequenz der TnC-Untereinheit (Van Eerd und Takahashi, 1976) sowie den Ca^{2+}-Bindungsdaten für die isolierte Untereinheit (Burtnick und Kay, 1977; Leavis und Kraft, 1978). Zwei Seiten zeigen eine hohe Ca^{2+}-Bindungsaffinität ($K_{Ca^{2+}} = 3 \times 10^8\ M^{-1}$); sie können auch Mg^{2+}-Ionen binden ($K_{Mg^{2+}} = 3 \times 10^3\ M^{-1}$). Eine dritte Seite vermag Ca^{2+}-Ionen spezifisch, allerdings mit niedrigerer Affinität zu binden ($K_{Ca^{2+}} = 2 \times 10^6\ M^{-1}$) (Johnson et al., 1980; Holroyde et al., 1980). Diese Ca^{2+}-spezifische Seite wird als entscheidend für die Regulation der Aktomyosin-ATPase angesehen (Robertson et al., 1981). Durch die Bindung der Ca^{2+}-Ionen an die TnC-Untereinheit werden in dieser konformationelle Veränderungen hervorgerufen, die an die TnI-Untereinheit weitergegeben werden und dadurch die Funktion der TnI-Untereinheit regulieren (Burtnick und Kay, 1976; Seamon et al., 1977; Grand et al., 1982).

Die Konformationsänderung des Troponins führt zu einer Verschiebung des Tropomyosins aus einer axialen Position in Bezug auf die Aktindoppelhelix in Richtung auf die Furche zwischen den beiden Aktinsträngen (Huxley, 1972; Seymour und O'Brien, 1980). Das Myosin kann dann mit vorher blockierten Bindungsstellen am Aktin in Wechselwirkung treten (Huxley, 1972).

Das stöchiometrische Verhältnis der drei Untereinheiten zu einander und damit das Molekulargewicht des Troponin-Komplexes sind umstritten. Für den Skelettmuskel-Komplex geben Ebashi et al. (1973), Greaser et al. (1973) und Potter (1974) eine 1:1:1 Stöchiometrie in Myofibrillen an. Sperling et al. (1979) bestimmen dagegen ein Verhältnis von 1:2:1 für den isolierten Komplex. Für das Herzmuskel-Troponin wird häufig in Analogie zum Skelettmuskel-Komplex eine 1:1:1-Stöchiometrie zugrundegelegt (Tsukui und Ebashi, 1973; Holroyde et al., 1980; Robertson et al., 1982). Um eine Klärung in dieser Frage zu erzielen, sollte in dieser Arbeit eine Bestimmung der Untereinheitsstöchiometrie für das Herzmuskel-Troponin durchgeführt werden.

Der Aktivitätszustand des kontraktilen Apparates wie auch der am Energiestoffwechsel beteiligten Enzyme wird durch nervöse und hormonelle Stimuli reguliert. Diesen beiden, von außen an die Zelle herangetragenen Reizen entsprechen intrazellulär verschiedene Signalwege, über die der Energiebedarf dem jeweiligen Aktivitätszustand der Muskelzelle angepaßt wird. Ein nervöser Reiz löst eine Depolarisation der Plasmamembran aus, die sich entlang der transversalen Tubuli (und zusätzlich der longitudinalen Tubuli der Herzmuskelfaser) weit ins Innere der Faser ausbreitet. Die Depolarisation bewirkt einen Ausstrom von Ca^{2+}-Ionen aus den endständigen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums, das einen intrazellulären Calciumspeicher darstellt, in das Sarkomer (Nelson und Benson, 1963). Die dadurch bedingte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration von ca. 50 nM auf 1-10 µM führt zur Sättigung des Troponins mit Ca^{2+} und dadurch zu einer Aufhebung seiner inhibitorischen Wirkung auf die Muskelkontraktion. Das biochemische Äquivalent dieser Zustandsänderung ist ein Anstieg der Aktomyosin-ATPase-Aktivität.

Hormonelle Reizung über ß-adrenerge Rezeptoren andererseits führt intrazellulär zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration auf Grund einer Aktivierung der Adenylatcyclase (Robinson et al., 1971). Bindung des cAMP an den inaktiven Komplex der cAMP-abhängigen Proteinkinase führt zur Dissoziation des Komplexes und damit zur Freisetzung der aktiven, katalytischen Untereinheit. Die cAMP-abhängige Proteinkinase zeigt eine breite Substratspezifität und kann eine Reihe verschiedener Proteine phosphorylieren (Hofmann und Schultz, 1980), darunter auch das Troponin.
Die Untereinheiten TnT und TnI sind Phosphoproteine; sie enthalten beide mehrere Phosphorylierungsseiten, deren Partialsequenzen und Lokalisation bekannt sind:
Die TnT-Untereinheit des Skelettmuskel-Troponins ist endogen am N-terminalen Serin-1 phosphoryliert (Pearlstone et al., 1976). Darüber hinaus kann sie durch Phosphorylase-Kinase an zwei verschiedenen Seiten phosphoryliert werden, am Serin-148 oder -149 und am Serin-156 oder -157 (Moir et al., 1977; Jaquet, 1983). Eine dem Serin-1 analoge Seite soll auch für die Herzmuskel-TnT-Untereinheit existieren (Moir und Perry, 1982; Gusev et al., 1983). In Abbildung 1 sind die Phosphorylierungsseiten in den TnI-Untereinheiten des Skelettmuskel- und Herzmuskel-Troponins dargestellt (nach Moir und Perry, 1980). Während die Phosphorylierungsseiten in der Skelettmuskel-TnI-Untereinheit durch die Komplexbildung mit der TnC-Untereinheit vollständig blockiert werden (Cole und Perry, 1975), trifft dies im Herzmuskel-Troponin nur für die Phosphorylierung des Threonins-138 und -162 durch die Phosphorylase-Kinase zu. Die Phosphorylierung am Serin-20 und -146 ist durch die Komplexbildung mit der TnC-Untereinheit nicht beeinflußt (Moir und Perry, 1977).
Für die TnI-Untereinheit des Herzmuskel-Troponins ist nachgewiesen, daß ihr Phosphorylierungszustand in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand des Herzmuskels geändert wird (Perry, 1979). Auf ß-adrenerge Stimulation hin erhöht sich der Phosphatgehalt der TnI-Untereinheit um bis zu 1.0 Mol P (England, 1976; Moir et al., 1980). In vitro-Versuche mit isoliertem Herzmuskel-Troponin und cAMP-abhängiger Proteinkinase führten zum

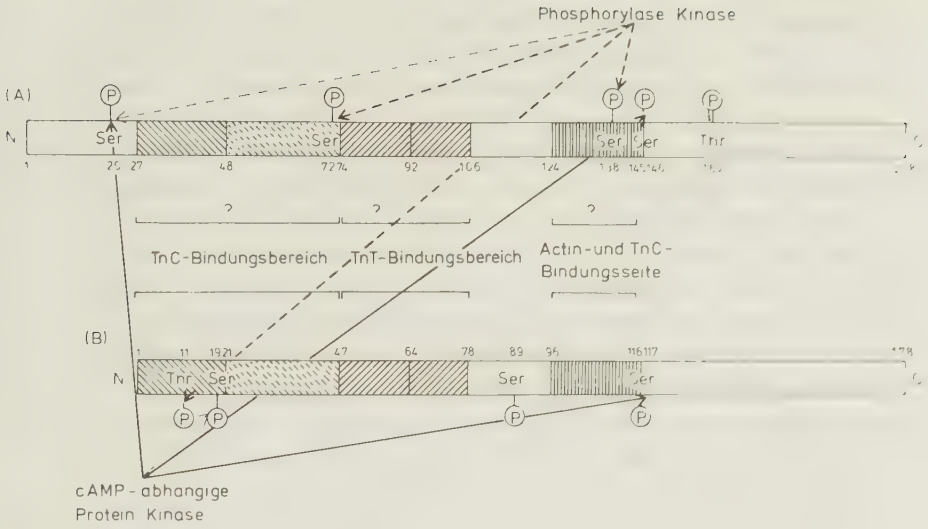


Abb. 1: Schematische Darstellung der Primärsequenzen und der biologisch aktiven Bereiche der TnI-Untereinheiten des Herzmuskel- und Skelettmuskeltroponins

Die Phosphorylierungsseiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase und der Phosphorylase-Kinase in den genannten TnI-Untereinheiten sind mit der entsprechenden Aminosäure und ihrer Position innerhalb der Primärsequenz angegeben, P ; Hauptphosphorylierungsseiten sind durch stärkere Pfeile gekennzeichnet. Die für die Skelettmuskel-TnI-Untereinheit bekannten Bindungsbereiche zu anderen Komponenten des dünnen Filaments sind angegeben. Die mit ? gekennzeichneten Bereiche der Herzmuskel-TnI-Untereinheit stellen homologe Bereiche dar, für die ein direkter Nachweis der Wechselwirkung zu den anderen Proteinkomponenten noch erbracht werden muß (Nach: Perry, 1979; Moir und Perry, 1980; und Chong und Hodges, 1982).
N: N-Terminus, C: C-Terminus; (A) Herzmuskel-TnI-Untereinheit, (B) Skelettmuskel-TnI-Untereinheit

gleichen Ergebnis (Moir und Perry, 1977). In beiden Fällen konnte die Serin-20-Seite als hauptsächliche Phosphorylierungsseite bestimmt werden (s. Abb. 1). Über die funktionellen Änderungen des Troponins auf Phosphorylierung hin gibt es widersprüchliche Aussagen.

Buss und Stull (1977) konnten keinen Einfluß der TnI-Phosphorylierung auf die Ca^{2+}-Bindungseigenschaften des Herzmuskel-Troponins feststellen. Robertson et al. (1982) beobachteten eine Verschiebung der Ca^{2+}-Bindungskurve für die Ca^{2+}-spezifische Bindungsseite zu höheren Ca^{2+}-Konzentrationen. Allerdings betrug der Unterschied zu der nichtphosphorylierten Kontrollprobe nur 0.25 pCa-Einheiten. Eine der letzten Messung vergleichbare Änderung der Ca^{2+}-Sensitivität ist für die Aktomyosin-ATPase nach Adrenalin-Stimulation in Herzmuskelfasern beobachtet worden (Bailin, 1979; Holroyde et al., 1979).

Dephosphorylierung des Skelettmuskel-Troponins, das am Serin-1 der TnT-Untereinheit phosphoryliert isoliert wurde, hat eine Veränderung der Mg^{2+}-Bindungseigenschaften des Troponins zur Folge, während die Ca^{2+}-Bindungseigenschaften durch die Dephosphorylierung nicht beeinflußt werden: Jahnke und Heilmeyer (1981) haben eine 30-fache Erniedrigung der Mg^{2+}-Bindungsaffinitäten an den Ca^{2+} Mg^{2+}-Bindungsseiten gemessen.

Vollständig offen geblieben ist, ob eine Phosphorylierung an der TnI- oder TnT-Untereinheit die Metallionen-Bindungseigenschaften an der TnC-Untereinheit beeinflussen kann. Spezifische und starke Wechselwirkungen der Troponin-Untereinheiten untereinander und die große Nähe der Komplexteile lassen eine konformationelle Informationsübertragung od. eine direkte Beteiligung der Phosphatgruppen an der Metallionenbindung andererseits erscheint ebenfalls nicht unmöglich. ^{31}P-Kernresonanzspektroskopie eröffnet die Möglichkeit, Veränderungen der chemischen Umgebung von Phosphatgruppen im Troponinkomplex direkt zu beobachten.

Eine Reihe von Reaktionstypen und -mechanismen sind in den letzten Jahren mit Hilfe der ^{31}P-Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt worden, bei denen phosphorhaltige Coenzyme, Intermediate, Substrate oder Produkte beteiligt sind. So wurde z.B.

die Wirkungsweise des Pyridoxalphosphates bei der phosphorolytischen Spaltung des Glykogens von verschiedenen Gruppen mit dieser Methode untersucht (Feldmann und Hull, 1977; Hoerl et al., 1979; Withers et al., 1981 a,b). In analoger Weise wurde die Rolle des Pyridoxalphosphates für den katalytischen Mechanismus der D-Serin-Dehydratase und der Tryptophanase zu klären versucht (Schnackerz und Feldmann, 1980; Schnackerz und Snell, 1983). Kovalente Modifikationen durch Phosphorylierung spezifischer Aminosäuren (Serin, Threonin, Histidin, Tyrosin) sind entsprechend mit dieser Methodik untersucht worden. Häufig wurde dabei die Veränderung der chemischen Umgebung der Phosphoaminosäure in Abhängigkeit von einer katalytisch notwendigen Metallionenbildung beobachtet. Beispiele dafür sind Untersuchungen an der alkalischen Phosphatase (Bock und Sheard, 1975), an der E.Coli Succinyl CoenzymA Synthetase (Vogel und Bridger, 1982) und an den Speicheldrüsenproteinen A und C (Bennick et al., 1981).
Eine Veränderung der chemischen Umgebung einer Phosphatgruppe sollte sich im ^{31}P-NMR-Spektrum aus der Gestalt und Lage des Resonanzsignals im Vergleich zu einer unbeeinflußten Referenzsubstanz zu erkennen geben. Eine direkte Beteiligung einer Phosphatgruppe an der Metallionenbindung des Troponin-Komplexes sollte sich z.B. in einer Veränderung der Linienbreite des Resonanzsignales widerspiegeln.
An den Muskelstrukturproteinen Skelettmuskel-Troponin und -Myosin ist die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der Phosphoserin-Signale von der Besetzung mit Metallionen untersucht worden. Das Resonanzsignal des Serin-1-Phosphates der TnT-Untereinheit zeigt keine Veränderung in Abhängigkeit vom Sättigungszustand des Proteins mit Ca^{2+}- oder Mg^{2+}-Ionen (Sperling et al., 1979). Auch die chemische Verschiebung des Phosphoserin-Signals des Myosins, phosphoryliert am Serin-14 oder -15 der P-Leichten Kette, erwies sich als Ca^{2+}-unabhängig (Koppitz et al., 1980). Man kann durchaus schließen, daß die Phosphatgruppen durch die Ca^{2+}-Bindung nicht beeinflußt werden, d.h. die Phosphatgruppen sind an der Metallionenbindung wahrscheinlich nicht direkt beteiligt.

Im Falle des Herzmuskel-Troponins ist eine Wechselwirkung zwischen Phosphorylierung und Metallionenbindung gezeigt worden. Eine Untersuchung des Herzmuskel-Troponins mit Hilfe der ^{31}P-Kernresonanzspektroskopie erscheint deshalb sinnvoll. Auf Grund des schlechten Massenverhältnisses von Phosphat zu Protein besteht die primäre Aufgabe darin, Herzmuskel-Troponin in ausreichender Menge zu präparieren. Besonders wichtig ist dabei, das Herzmuskel-Troponin, wie im Fall des Skelettmuskel-Troponins, proteasefrei zu präparieren, um einen Abbau während der Akkumulationsphase des NMR-Spektrums zu verhindern. Will man den Troponin-Komplex in einer möglichst nativen Form untersuchen, so muß verhindert werden, daß während der Präparation das endogene Phosphat ausgebaut wird.

Troponin aus Herzmuskel enthält sowohl in der TnT- wie auch in der TnI-Untereinheit 0.2-0.4 Mol Phosphat/Mol Untereinheit (Stull, 1980), das in der TnI-Untereinheit hauptsächlich in der Serin-20-Seite lokalisiert ist. Es ist zu prüfen, inwieweit der Phosphatgehalt zu erhöhen ist, möglicherweise durch Modifikation des Präparationsverfahrens, oder durch eine Phosphorylierung, z.B. mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase, wodurch bestimmte Phosphorylierungsseiten charakterisierbar werden sollten.
In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß durch Modifikation des LiCl-Extraktionsverfahrens von Tsukui und Ebashi (1973) Herzmuskel-Troponin in der gewünschten Reinheit bezüglich Protease- und Phosphatase-Verunreinigung präpariert werden kann. Das erhaltene Troponin wird im Hinblick auf seine Stöchiometrie und seine hydrodynamischen Eigenschaften charakterisiert. Das Material enthält durchschnittlich 0.7 Mol Phosphat in der TnT- und 1.4 Mol Phosphat in der TnI-Untereinheit.

Eine Zuordnung der ^{31}P-NMR-Signale läßt sich durch Vergleich der Spektren von phosphoryliertem mit partiell dephosphoryliertem Troponin erzielen. Die Signale zeigen auf Zugabe von Mg^{2+} eine deutliche Verschiebung in Richtung auf einen veränderten Protonierungsgrad.

Alle Signale zeigen eine geringe Linienbreite, woraus auf eine freie Beweglichkeit der Phosphatgruppen geschlossen werden kann, die vermutlich an der Oberfläche des Proteinkomplexes lokalisiert sind. Den Phosphatgruppen könnte eine Funktion als lokale Puffersubstanz zukommen. Die Phosphorylierung an der TnI-Untereinheit schwächt die TnI-TnC-Wechselwirkung, wodurch die Übertragung des Signals: 'Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+}-Spiegels' auf das dünne Filament beeinflußt wird.

2. Methoden

2.1. Präparative Methoden

2.1.1. Präparation des Troponins aus Rinderherzmuskel modifiziert (nach Tsukui und Ebashi (1973))

Rinderherzen wurden unmittelbar nach der Öffnung des Brustraumes den Tieren entnommen und nach dem Aufschneiden der Herzkammern auf Eis gelegt. Der Transport vom Bochumer Schlachthof zur Universität erfolgte unter Eiskühlung; von Entnahme der Herzen aus dem Tierkörper bis zum Beginn der Troponin-Präparation vergingen etwa 45 Minuten.
Alle beschriebenen Arbeiten wurden im Kühlraum bei 4 ^{o}C durchgeführt. Das Muskelgewebe wurde von Fett und Bindegewebe vollständig befreit und bei Verwendung der kleinsten Porengröße der Lochscheibe (1 mm) mit einem Fleischwolf zerkleinert. 1000-1200 g Muskelfleisch wurden mit 3.8 - 4.0 L Guba-Straub-Lösung (Lösung A: 0.3 M KCl; 0.1 M KH_2PO_4; 0.05 M K_2HPO_4) versetzt; das Gesamtvolumen der Suspension von 5 L enthielt zusätzlich 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1 mM PMSF, 0.2 mM Benzamidin und 0.2 mM ATP. Die Suspension wurde 30 Min. gerührt und danach auf einem Büchnertrichter über Gaze abgesaugt.

Der Rückstand wurde 5 Min. in 3 L der Lösung B (1 mM $KHCO_3$, 5 mM EDTA, 25 mM NaF, 0.1 mM PMSF, 0.2 mM Benzamidin) gerührt und danach wiederum über Gaze filtriert. Anschließend wurde der Rückstand 4 x mit jeweils 3 L der Lösung C (0.1 M KCl, 1 mM $KHCO_3$, 1 mM EDTA, 25 mM NaF) wiederaufgenommen, 5 Min. gerührt und über Gaze filtriert; der 1. Waschungsschritt mit Lösung C enthielt außerdem 0.1 mM PMSF und 0.2 mM Benzamidin. Im Anschluß an diese Waschschritte wurde der Rückstand in Lösung D (1 mM $KHCO_3$, 25 mM NaF, 1 mM EDTA) aufgenommen und über Gaze filtriert.
Der Rückstand wurde mit 2 M LiCl, Wasser und anderen, entsprechend konzentrierten Lösungen versetzt, so daß 4.8 L einer 0.4 M LiCl, 1mM EDTA, 25 mM NaF, 0.1 mM PMSF, 0.2 mM Benza-

midin-Lösung entstanden. Über einen Zeitraum von 2.5 Std. wurde durch Zugabe 1 N HCl mit Hilfe eines Autotitrators ein pH von 5.1 eingestellt.
Die Suspension wurde anschließend bei 7000xg für 20 Min. zentrifugiert. Im Überstand wurde danach durch Zugabe von 1 N NaOH ein pH-Wert von 7.5 eingestellt (Aliquot A1). Die Lösung wurde mit 19 g $(NH_4)_2SO_4$ und 84 mg $NaHCO_3$ pro 100 mL Lösung versetzt und für 30 Min. gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde für 20 Min. bei 15000xg abzentrifugiert. Dem Überstand (Aliquot A2) wurden 8.5 g $(NH_4)_2SO_4$ pro 100 mL Lösung zugesetzt, die Lösung wurde 15 Min. gerührt, der Niederschlag für 20 Min. bei 15000xg abzentrifugiert.
Nach sorgfältiger und vollständiger Entfernung des Überstandes (Aliquot A3) wurde das Pellet in Lösung E (10 mM Tris, pH 7.8, 1 mM DTE, 10 mM KF) wiederaufgenommen. Durch weitere Zugabe von Lösung E wurde die Rohtroponin-Lösung bis auf eine Leitfähigkeit von 5.0 mS verdünnt, der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 N HCl auf 6.5 erniedrigt. Der während dieses Vorgangs entstandene Niederschlag wurde für 25 Min. bei 15000xg abzentrifugiert. Im Überstand wurde danach der pH wieder auf 7.8 eingestellt (Rohtroponin-Lösung; Aliquot RTN).
Die Lösung wurde mit 4 mL sedimentierter DEAE-Cellulose Suspension/100 mL Lösung, äquilibriert in Puffer E, versetzt und für 15 Min. gerührt. Nach dem Absetzen der DEAE-Cellulose wurde der Überstand dekantiert, erneut mit 1 mL DEAE-Cellulose/ 100 mL Rohtroponinlösung versetzt, für 20 Min. gerührt und die DEAE-Cellulose durch Dekantieren des Überstandes erhalten.

Die vereinigten DEAE-Cellulose-Sedimente wurden in eine 2.5 cm Ø Säule gepackt und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 - 16 mL x cm^{-2} x h^{-1} mit einem Puffer von 0.1 M KCl, 0.1 mM EDTA, 25 mM KF, 20 mM Tris, pH 7.8, 1 mM DTE 8 Std. gewaschen.
Danach wurde die Säule mit obigem Puffer, der 0.5 m KCl enthält, eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt; durch Zugabe gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung wurde das Troponin zwischen 32 % und 45 % Sättigung ausgefällt.

Der Niederschlag wurde in Puffer F (0.5 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 15 mM ME) wiederaufgenommen (maximales Volumen: 50 mL), die Proteinlösung wurde durch Zentrifugation bei 100000xg für 15 Min. geklärt und danach auf eine 5/90 cm Sephacryl S 300 Säule aufgetragen, die in Puffer F äquilibriert war (Durchflußgeschw.: 96 mL/h, Fraktionsvol.: 10 mL).
Die Fraktionen des Säulenlaufes wurden auf alk. und saure Phosphatase-Aktivität (s. 2.2.1) getestet, die troponinhaltigen Fraktionen (nach K_{av}-Wert) wurden durch SDS-Gele (s. 2.2.3.1. (b)) charakterisiert. Die Troponin-Fraktionen, die nach SDS-Gelen frei von Fremdproteinen waren und in denen keine Phosphatase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt und durch Zugabe von 20 mM Tris, pH 7.5, 15 mM ME-Puffer auf eine KCL-Konzentration von 0.12 M KCl verdünnt. Die Proteinlösung wurde mit 50 mL DEAE-Sephacel, äquilibriert im gleichen Puffer, versetzt, für 20 Min. gerührt und danach in eine 2.5 cm Ø-Säule eingeschlemmt. Die Säule wurde bei einer Durchflußgeschw. von 75 mL/h mit dem gleichen Puffer, der zusätzlich 0.5 M KCl enthält, eluiert.
Die Troponin-haltigen Fraktionen wurden entweder direkt eingefroren (-20 °C) oder durch Dialyse gegen eine 70 %ige Glycerinlösung (70 % Glycerin, 0.2 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 15 mM ME, 0.5 mM EDTA) konzentriert und auf eine Glycerinkonzentration von 45 % eingestellt. Die glycerinhaltige Probe wurde ebenfalls bei - 20 °C aufbewahrt.

2.1.2. Auftrennung des Troponinkomplexes in seine Untereinheiten TnT, TnI, und TnC (nach Hincke, McCubbin und Kay, 1975, 1976) (halbpräparativer Maßstab)

DEAE-Sephadex A 25 wurde in 8 M Harnstoff, 20 mM TRIS pH 7.8, 1 mM EDTA, 1.0 mM DTE oder 15 mM ME äquilibriert (Harnstoff-Puffer A). Aliquote reiner Troponin-Chargen wurden mit Harnstoff-Puffer A auf eine Konzentration von 4 - 6mg/mL verdünnt und durch Dialyse gegen einen 25-fachen Überschuß an Harnstoff-Puffer A mit diesem äquilibriert.

Das äquilibrierte DEAE-Sephadex-Gelmaterial wurde in eine Säule (0.84 cm Ø,10 cm Länge) gefüllt. Die Proteinlösung wurde auf die DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen, Durchflußgeschwindigkeit von 4 mL/h (= 7 $mL \times cm^{-2} \times h^{-1}$), und es wurde mit einer 50 mM KCl-Lösung (im Harnstoff-Puffer A) nachgewaschen. Die Elution des Proteins von der Säule wurde im Durchflußphotometer bei 280 nm verfolgt.
War nach der Elution des nicht absorbierten Materials die Anfangsgrundlinie wieder erreicht, wurde mit 0.25 M KCl (im Harnstoff-Puffer A) ein weiterer Teil des Proteins von der DEAE-Sephadex-Säule eluiert. Erfolgte bei dieser Salzkonzentration keine Proteinelution mehr (Nachweis mit Hilfe des Bradford-Tests) wurde mit 0.4M KCl in Harnstoff-Puffer A das restliche Protein eluiert.
Von den proteinhaltigen Fraktionen wurden SDS-Gele (nach Cohen, Kap. 2.2.3.1) angefertigt. Die drei KCl-Konzentrationen eluieren nacheinander die Untereinheiten TnI, TnT und TnC.

Für weitere analytische Untersuchungen wurden die Fraktionen der einzelnen Untereinheiten vereinigt und über einen PM-10 Filter in einer Amicron-Ultrafiltrationszelle konzentriert und über eine Sephacryl S 300 Säule (1.5/90) in 6 M Harnstoff, 100 mM KCl, 20 mM TRIS, pH 7.5, 15 mM ME gelfiltriert.

Für die Bestimmung des endogenen Phosphatgehaltes in den Untereinheiten wurden die Fraktionen der DEAE-Sephadex-Läufe direkt eingesetzt.

2.1.3. Präparation des Herzmuskel-Tropomyosins

Als Ausgangsmaterial für die Präparation des Herzmuskel-Tropomyosins diente der Überstand der 45 % Ammoniumsulfatfällung (Aliquot A3, s. 2.1.1.). Ammoniumsulfat wurde bis zu einer Konzentration von 70 % zugegeben. Der dabei entstehende Niederschlag wurde 60' bei 15000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das weiche Pellet wurde in 1000 mL 1.0 M KCl, 20 mM TRIS pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM KF, 15 mM ME aufgenommen. Durch Zugabe einer bei 4 °C gesättigten

Ammoniumsulfatlösung wurde erneut das Protein im Bereich zwischen 45 % und 65 % Sättigung ausgefällt. Der Niederschlag wurde in 40 mL 0.5 M KCl, 20 mM TRIS, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 25 mM KF, 15 mM ME aufgenommen und durch Zentrifugation bei 40000xg geklärt. Diese Lösung wurde auf eine Sephacryl S 300 Säule aufgetragen (5/60), die im gleichen Puffer äquilibriert war. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 96 mL/h, das Fraktionsvolumen 5 mL. Die Fraktionen des Säulenlaufes wurden auf alk. und saure Phosphatase-Aktivität getestet. Die Fraktionen 70-88 wurden vereinigt und das Tropomyosin durch Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert, in 50 mM KCl, 20 mM TRIS, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTE-Puffer gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde bei -20 ^{o}C aufbewahrt.
Zur Reinheitskontrolle und Charakterisierung wurden 10 % SDS-Polyacrylamid-Gele herangezogen (Kap. 2.2.3.). Der Phosphatgehalt des Tropomyosins wurde nach Kap. 2.1.6. bestimmt.

2.1.4. Anreicherung der endogenen Phosphatase-Aktivitäten

Die bei der Präparation des Herzmuskeltroponins anfallenden phosphatasehaltigen Fraktionen wurden getrennt aufgearbeitet und angereichert, um ihre Substratspezifität für das Troponin testen zu können.

(a) Mn^{2+}-stimulierbare, alkalische Phosphatase-Aktivität

In den Troponin-enthaltenden Fraktionen nach dem DEAE-Cellulose Reinigungsschritt (s. 2.1.1.) war eine im alkalischen aktive, durch Mn^{2+}-stimulierbare Phosphatase-Aktivität festgestellt worden. Die zur Abtrennung der Phosphatase vom Troponin durchgeführte Gelfiltration (Sephacryl S 300) zeigte einen Aktivitäts-Gipfel für diese Phosphatase, der unmittelbar nach dem Troponin von der Säule eluierte (K_{av}(TN): 0.11, K_{av}(Phospha.): 0.28).
Die Fraktionen dieses Gipfels wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfatfällung (zwischen 30 und 50 % Sättigung) konzentriert. Der Niederschlag wurde in 0.5 M KCl, 20 mM Tris,

pH 7.5, 15 mM ME gelöst und durch Dialyse gegen einen 66 % Glycerin-Puffer gleicher Zusammensetzung konzentriert. Zur Reaktivierung der Phosphatase-Aktivität wurden Aliquote dieser Fraktion vor Inkubationstests gegen eine 0.1 mM Mn^{2+}-Lösung des entsprechenden Puffers dialysiert. Der Inkubationspuffer hatte ebenfalls eine Konzentration von 0.1 mM Mn^{2+}.

(b) Saure Phosphatase-Aktivität

Tests auf saure Phosphatase-Aktivität (2.2.1.(b)) hatten ergeben, daß bei der Reinigung des Troponins die vorhandene saure Phosphatase-Aktivität durch die DEAE-Cellulose-Chromatographie von Troponin abgetrennt wurde; die Phosphatase eluierte im Durchlauf oder in der 0.1 M KCl-Stufe des DEAE-Cellulose-Schrittes. Durch Ammoniumsulfatfällung bis 60 %-Sättigung wurden die Proteine in den vereinigten Volumina des Durchlaufes und der 0.1 M KCl-Stufe konzentriert. Das ausgefällte Protein wurde in 20 mL 20 mM TRIS, pH 7.5, 1 mM EDTA, 15 mM ME gelöst und gegen 5 L des gleichen Puffers dialysiert; präzipitiertes Material wurde abzentrifugiert. Durch Zugabe von KCl wurde in der phosphatasehaltigen Lösung eine Konzentration von 0.5 M KCl eingestellt. Die Probe wurde auf eine Sephacryl S 300 Säule (5/90) aufgetragen, die in 0.5 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 25 mM KF, 15 mM ME äquilibriert war. (Durchflußgeschw.: 96 mL/h, Fraktionsvol.: 10 mL). Die Fraktionen des Säulenlaufes wurden nach 2.2.1.(b) auf saure Phosphatase-Aktivität getestet. Die Fraktionen des Aktivitäts-Gipfels (K_{av}: 0.49) wurden vereinigt und durch Dialyse gegen 0.5 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 15 mM ME 66 % Glycerin konzentriert. Die glycerinisierte Probe wurde bei -20 °C aufbewahrt; für Inkubationstests wurden Aliquote der Probe direkt eingesetzt.

2.1.5. Präparation der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (nach Beavo, Bechtel und Krebs, 1974)

Die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase wurde nach der von Beavo et al. (1974) angegebenen Methode präpariert.
Geringfügige Änderungen betrafen den cAMP-Gehalt der Waschlösungen des CM-Sephadex C50-Gels nach der Adsorption der katalytischen Untereinheit und das Konzentrierungsverfahren vor dem Auftragen auf die Sephadex G 100-Säule.

2.1.6. Bestimmung des proteingebundenen Phosphatgehaltes im Troponin und in seinen Untereinheiten (nach Bartlett, 1959)

Für die Bestimmung des proteingebundenen Phosphatgehaltes im Troponin wurde darauf geachtet, nur phosphatfreie Gefäße und Reagenzien zu benutzen.
Aliquote von 4 - 5 mg Troponin und 1 - 2 mg der Untereinheiten wurden mit kaltem $H_2O_{bidest.}$ auf 4 mL aufgefüllt und durch Zugabe von 4 mL kalter, 20 % TCA-Lösung gefällt. Die Lösungen wurden für 15 Min. auf Eis gestellt, danach wurde der Niederschlag für 20 Min. in einer Tischzentrifuge bei 5000xg abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in möglichst wenig 99 % Ameisensäure unter Erwärmen bei max. 50 °C wieder gelöst. Die Lösung wurde durch Zugabe von 4 mL kaltem H_2O_{bidest} verdünnt und erneut durch Zugabe von 20 % TCA-Lösung gefällt. Der Vorgang wurde 1 x wiederholt.
Im Anschluß daran wurde der Proteinniederschlag je nach eingesetzter Proteinmenge in 1.0 bzw. 0.5 mL 99 % Ameisensäure aufgenommen. Der Proteingehalt dieser Lösungen wurde nach Kap. 2.2.8. bestimmt.
Aliquote dieser Lösungen (100-250 µL) wurden mit 700-550 µL $H_2O_{bidest.}$ und 200 µL 10 N H_2SO_4 versetzt. Bei 180 °C wurde für 12 Std. das Protein verkohlt. Danach wurden die Proben mit 200 µL $H_2O_{bidest.}$ und 500 µL 30 % H_2O_2 versetzt zur Oxidation

des entstanden Kohlenstoffes. Bei 180 °C wurde das eingesetzte H_2O_2 innerhalb von 2-3 Std. quantitativ verkocht. Der Vorgang wurde solange wiederholt (mindestens 1 x), bis nach dem Verkochen nur eine farblose, klare Flüssigkeit zurückblieb. Zum Nachweis des freien, anorg. Phosphates in der Lösung wurde zu der verbleibenden Restlösung 650 µL $H_2O_{bidest.}$, 200 µL 5 % wässrige Ammoniumheptamolybdatlösung und 50 µL ANSA-Lösung (s. unten) zugegeben. Die Proben wurden für 7 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt.
Die Blindwerte und die Proben der Eichgeraden waren in gleicher Weise mit H_2SO_4-Inkubation und H_2O_2-Oxidation behandelt worden. Die Extinktion der Proben wurde bei 820 nm bestimmt. Die Phosphatwerte der Troponin-Proben ließen sich auf Grund der Eichgraden bestimmen.

ANSA (1-Amino-2-hydroxy-naphthalinsulfonsäure-(4))-Lösung

30 g $NaHSO_4$ wurden in 200 mL H_2O_{bidest} gelöst; zu dieser Lösung wurden 0.5 g ANSA zugegeben und ca. 15 Min. gerührt. Anschließend wurde 1 g wasserfreies Na_2SO_3 zugesetzt und im Wasserbad bei 50 °C solange gerührt, bis eine vollständige Lösung erreicht war. Die Lösung wurde vor der weiteren Verwendung filtriert; sie wurde bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahrt. Vor dem Einsatz im Test wurde auskristallisiertes Material durch Erwärmen auf 50 °C wieder gelöst.

2.1.7. Dephosphorylierung des Herzmuskel-Troponinkomplexes

2.1.7.1. Inkubation mit alk. Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer)

Herzmuskel-Troponin (5mg/mL) wurde in 0.1 M Glycin, 0.1 mM $ZnCl_2$, pH 9.0 und 5 µL alk. Phosphatase (Boehringer, Reinheitsgrad I) je 5 mL Proteinlösung 60' bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch EDTA gestoppt und das Troponin durch eine Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert. Der Niederschlag wurde in 0.5 M KCl, 20 mM TRIS, 0.1 mM EDTA, 15 mM ME, pH 7.5 gelöst und die Lösung auf eine Sephacryl S 300 Säule aufge-

tragen. Die Fraktionen des Säulenlaufes wurden auf alk. Phosphatase-Aktivität (Kap. 2.2.1.(c)) und Protein (Kap. 2.2.8.) getestet. Die troponinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert.

2.1.7.2. Inkubation mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln

Zur Vorbereitung der Inkubation des Herzmuskeltroponins mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln wurde die vorliegende Enzymcharge (Boehringer, Reinheitsgrad II) gereinigt: 5.5 mg der sauren Phosphatase-Charge wurden in 0.5 mL (0.5 M KCl, 20 mM TRIS, 1 mM EDTA, 15 mM ME, pH 7.5) aufgenommen, auf eine 1.5/90 cm Sephacryl S 300 Säule aufgetragen und mit dem obigen Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden auf saure Phosphatase-Aktivität getestet (Kap. 2.2.1.(b)) und aktivitätshaltige Fraktionen durch eine Glycerindialyse konzentriert. Die Phosphatase-Probe wurde bei -20 ^{o}C aufbewahrt.
Herzmuskeltroponin (10 mg/mL) wurde mit 50 µL der sauren Phosphatase-Lösung pro 10 mg Troponin versetzt. Die Inkubation erfolgte bei pH 6.5 für 2 Std. bei 30 ^{o}C in 50 mM KCl, 20 mM TRIS, 15 mM ME, 50 µM $CaCl_2$. Die Reaktion wurde durch pH-Wert-Erhöhung auf 7.5 und Abkühlung der Reaktionslösung auf 0 ^{o}C gestoppt. Das Troponin wurde durch Gelfiltration über eine Sephacryl S 300 Säule (0.5 M KCl, 20 mM TRIS, 0.1 mM EDTA, 15 mM ME, pH 7.5) von der sauren Phosphatase getrennt.

2.1.7.3. Inkubation mit endogenen Phosphatasen der Herzmuskeltroponin-Präparation

Die bei der Präparation des Herzmuskeltroponins angefallenen Phosphatase-Chargen (2.1.4. (a) und (b)) wurden in Inkubationstests mit Troponin eingesetzt, um ihre Spezifität im Hinblick auf die proteingebundenen Phosphatgruppen der Herzmuskel-Troponins zu testen.

Der proteingebundene Phosphatgehalt nach der Inkubation wurde sowohl für den Holotroponin-Komplex wie auch für die isolierten Untereinheiten bestimmt (s. Kap. 2.1.6.).

(a) Inkubation mit der alk., Mn^{2+}-abh. Phosphatase-Aktivität

Troponin (10 mg/mL) wurde mit 0.5 mL der Phosphatase in: 0.5 M KCl, 50 mM TRIS, 20 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $MnCl_1$, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 7.5, für 2 Std. bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Ammoniumsulfatfällung gestoppt. Das Troponin wurde wie unter 2.1.7.1. beschrieben durch Gelfiltration über eine Sephacryl S 300 Säule abgetrennt.

(b) Inkubation mit saurer Phosphatase-Aktivität

Die saure Phosphatase-Aktivität, die nach 2.1.4.(b) als Kontamination der Herzmuskel-Troponin-Präparation isoliert worden war, wurde unter identischen Bedingungen wie die saure Phosphatase aus Kartoffeln eingesetzt, mit der Ausnahme, daß die KCl-Konzentration 0.5 M betrug.

2.1.8. Phosphorylierung des Herzmuskel-Troponins

2.1.8.1. Phosphorylierung mit cAMP-abhängiger Proteinkinase

(a) Analytischer Ansatz

200-500 µg Herzmuskel-Troponin in 200-500 µL Testansatz wurden mit 5 µL cAMP-abhängigen Proteinkinase-Lösung (katalytische Untereinheit) in 0.1 M KCl, 20 mM Tris, 0.5 mM DTE, 0.1 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 100 µM $CaCl_2$, 0.5 mM ATP-γ-^{32}P (2 µCi/200 µL), pH 7.0 bei 30 °C inkubiert. 25 µL Aliquote wurden in bestimmten Zeitabständen entnommen, auf Glasfaserplättchen pipettiert und durch Waschung in TCA-Lösung überschüssiges, radioaktives ATP-γ-^{32}P ausgespült (2.2.10.: Messung des ^{32}P-Phosphateinbaues in Proteine nach Mars und Novelli).

(b) Präparativer Ansatz

50-100 mg/15 mL Herzmuskel-Troponin wurden unter identischen Pufferbedingungen wie beim analytischen Ansatz inkubiert, mit der Ausnahme, daß kein radioaktiv markiertes ATP eingesetzt wurde. 300-500 µL der cAMP-abhängigen-Proteinkinase-Lösung wurden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 1 Std. durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 5 mM und durch Abkühlen der Lösung im Eisbad gestoppt. Der pH-Wert wurde auf 7.8 erhöht. Über eine 2.5/18 cm Sephadex G 25-Säule wurde überschüssiges ATP und ADP abgetrennt und das Protein in folgenden Puffer überführt: 0.1 M KCl, 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 15 mM ME, pH 7.8. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und auf eine 1.5/10 cm DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen, die im gleichen Puffer äquilibriert war.
Im Durchlauf dieser Säule wurde die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase eluiert. Das Troponin wurde durch 0.5 M KCl im gleichen Puffer eluiert.
Der Phosphorylierungsgrad wurde durch Bestimmung des proteingebundenen Phosphates ermittelt (Kap. 2.1.6.).

2.1.8.2. Phosphorylierung mit der Ca^{2}-abhängigen Phosphorylase-b-Kinase

Die Phosphorylierung mit Phosphorylase-Kinase erfolgte unter folgenden Bedingungen:
1.0 mg cTn/ mL Testansatz (50 mM Tris, pH 7.2, 1.0 mM DTE, 4 mM $MgAc_2$ oder $MgCl_2$, 100 µM $CaCl_2$, 50 µg Phosphorylase-b-Kinase/mL 2 mM ATP-γ-^{32}P (10 µCi/mL). Zum Test auf die Phosphorylierung im Ca^{2+}-freien Zustand wurde an Stelle der Ca^{2+}-Lösung 0.1 mM EGTA eingesetzt. Der Phosphorylierungsverlauf wurde wie unter 2.2.10. beschrieben verfolgt.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Test auf alk. und saure Phosphatase-Aktivität

(a) Test auf alk. Phosphatase-Aktivität

Lösung A: 100 mM Tris, 50 mM $MgCl_2$, pH 8.5
Lösung B: 15 mM p-Nitrophenylphosphat
Lösung C: 2 mM p-Nitrophenolat (Standardlösung)
Lösung C: 0.1 M NaOH

Je 250 µL der Lösungen A und B wurden zusammengegeben und für 5' bei 37 °C in einem Wasserbad temperiert. Danach wurden 20-40 µL der zu untersuchenden Probe zugesetzt. Die Proben wurden für 30' bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.0 mL der Lösung D gestoppt. Die Extinktion der Lösung wurde nach einer Zentrifugation für 15' in einer Tischzentrifuge bei 405 nm gegen Wasser bestimmt. Analysenleerwert, Reagenzienleerwert und Standardprobe wurden unter identischen Bedingungen getestet.

Zur Reaktivierung der alk. Phosphatase-Aktivität (in den Ammoniumsulfatfällungs-Überständen, DEAE-Cellulose-Aliquoten, Sephacryl S 300 Säulenläufen), wurde in der Lösung A eine Konzentration von 0.1 mM $MnCl_2$ eingestellt. Der Test erfolgt dann in der Weise, daß zuerst Lösung A mit der zu untersuchenden Probe für 10' bei 37 °C inkubiert wurde und danach die Reaktion durch Zugabe der Lösung B gestartet wurde.

Die alk. Phosphatase-Aktivität wurde wie folgt ausgedrückt:

E(A) Extinktionswert der Analysenprobe
E(AL) " des Analysenleerwertes
E(RL) " des Reagenzienleerwertes
E(ST) " der Standardlösung

$$mU = \frac{E(A) - E(AL) - E(RL)}{E(ST)} \cdot 66.7 \qquad \left[nMol \times min^{-1} \times mL^{-1}\right]$$

(b) Test auf saure Phosphatase-Aktivität

Zur Bestimmung der sauren Phosphatase-Aktivität wurde dieselbe Methodik angewendet wie für die Bestimmung der alk. Phosphatase-Aktivität. Die Inkubation erfolgte bei einem pH-Wert von 5.0.

Lösung A: 90 mM Citrat, pH 5.0 (mit NaOH eingestellt)
Lösung B: 15 mM p-Nitrophenylphosphat
Lösung C: 0.2 mM p-Nitrophenolat (Standardlösung)
Je 0.5 mL der Lösungen A und B wurden zusammenpipettiert und für 5' bei 37 °C temperiert. 100 µL der zu untersuchenden Probe wurden danach zugegeben und für 30' inkubiert. Durch Zugabe von 2.5 mL 0.1 M NaOH wurde die Inkubation gestoppt. Die Extinktion der Lösung wurde nach einer 15-minütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 405 nm gegen Wasser bestimmt.
Die Bestimmung der sauren Phosphatase-Aktivität ergab sich aus folgender Gleichung:

$$mU \left[nMolxmin^{-1}xmL^{-1}\right] = \frac{E(A) - E(AL) - E(RL)}{E(ST)} \cdot 6.67$$

(c) Test auf Zn^{2+}/Mg^{2+}-abh., alkalische Phosphatase-Aktivität

Für den Nachweis der alk. Phosphatase aus Kälberdarm wurde ein Aliquot der Stammlösung des alk. Phosphatase-Inkubationsmediums (1 M Glycin, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$, pH 10.5) mit Wasser 1 : 10 verdünnt und mit einem Aliquot der zu untersuchenden Probe versetzt; das Gesamtvolumen betrug 500 µL. Die Lösung enthielt 15 mM an p-Nitrophenylphosphat. Die Inkubation erfolgte für 30 Min. bei 37 °C; die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mL 0.1 M NaOH gestoppt. Nach einer Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15 Min.) wurde die Extinktion der Lösung bei 405 nM bestimmt.

2.2.2. Stabilitätstest der Troponinchargen auf proteolytische Aktivität

100 µg Herzmuskel-Troponin wurden bei 30 °C für 2 Stunden in 50 mM Tris, pH 7.2; 15 mM ME oder 1 mM DTE; 5 mM $MgCl_2$; 0.5 mM $CaCl_2$ oder 1 mM EGTA inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 200 µL. Alle 30 Min. wurden 40 µL entnommen und mit 10 %iger TCA-Lösung das Protein gefällt. Der Troponinkomplex wurde auf Polyacrylamid-Gelen (nach 2.2.3.1.) aufgetrennt

Das Auftreten von Proteolyseprodukten mit apparenten Molekulargewichten von 33000, 23000, 14000 D oder ihre Intensivierung deutete auf die Anwesenheit proteolytischer Aktivität.

2.2.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.2.3.1. Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS

Die Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS erfolgte entweder nach der Methode von Weber und Osborn (1969) oder nach der Modifikation dieser Methode nach Cohen (1973). Es wurden ausschließlich 10 % Polyacrylamid-Gele verwendet.

2.2.3.2. Quantitative Auswertung von SDS-Elektrophorese-Gelen

Zur Bestimmung der relativen Proteinmengen verschiedener Banden auf den gefärbten Polyacrylamid-Gelen wurden die Gele mit einem Zeiss-Photometer PMQ II, das mit einem Densitometrier-Zusatzgerät ZK 4 ausgerüstet war, der Länge nach photometriert. Zur Bestimmung der Färbefaktoren der Troponin-Untereinheiten für den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg; C.I. 42660) wurde wie folgt vorgegangen: Ausgehend von einer Proteinstammlösung (1 mg/mL) der jeweiligen Untereinheit (präpariert nach 2.1.2.) wurden Proben hergestellt, die in 50 µL SDS-Probenpuffer zwischen 0.5 und 5 µg Protein enthielten. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Cohen (2.2.3.1.), die wie üblich ge- und entfärbt wurden. Die Färbeintensität der Banden wurde bestimmt, indem jedes Gel 2x unter Drehung um 90 ^{o}C densitometriert wurde. Für jede Konzentration wurde der Mittelwert dieser Bestimmungen gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen. Aus den so erhaltenen Eichgeraden ließen sich die relativen Färbefaktoren der Troponinuntereinheiten bestimmen.

2.2.3.3. Isoelektrische Fokussierung nach der NEPHGE-Methode (nach O'Farrell et al., 1977)

Zur isoelektrischen Fokussierung von basischen Proteinen hatte sich die NEPHGE-(non-equilibrium pH-gradient elektrophorisis)-Methode nach O'Farrell et al. bewährt.
Für die Trennung der unterschiedlich geladenen Untereinheitskomponenten des Herzmuskel-Phosphotroponins wurde eine eindimensionale Elektrophorese in diesem System durchgeführt, indem das von Anderson und Anderson (1978) beschriebene Gerät und Verfahren für die isoelektrische Fokussierung in Röhrchengelen angewendet wurde:
Eine Lösung folgender Zusammensetzung wurde in die Gelröhrchen gegeben: 9.2 M Harnstoff, 2 % Nonidet P-40, 6 % Acrylamid/Bisacrylamid (ausgehend von einer 30 % Stammlösung, die 28.4 % Acrylamid und 1.6 % Bisacrylamid enthielt), und 2 % Servalyt (pH 3.5 - 10); 14 µL TEMED/10 mL Gellösung wurden zugesetzt und die Lösung unter Wasserstrahlvakuum entgast. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 20 µL 10 % Ammoniumperoxidisulfat-Lösung/10 mL Gellösung gestartet. Die Gelröhrchen wurden nach dem bei Anderson und Anderson angegebenen 'Tauchverfahren' gefüllt. Die Gele wurden mit H_2O überschichtet; die Polymerisation der Gel war nach 2 Std. beendet. Das Überschichtungswasser wurde vor dem Beladen der Gele entfernt.

Die untere Elektrophorese-Kammer wurde mit 0.02 N NaOH (CO_2-frei) gefüllt und die Röhrchen in die Kammer eingesetzt. Die Proben (10-50 µg/Röhrchen) wurden in 30-100 µL Probenpuffer (9 M Harnstoff, 4 % Nonidet P-40, 2 % ME und 2 % Servalyt) auf die Gele aufgetragen und mit 20 µL Überschichtungspuffer (8 M Harnstoff, 1 % Servalyt pH 3.5-10) überschichtet. Die Gelröhrchen wurden mit 0.01 M H_3PO_4 aufgefüllt. Die obere Elektrophorese-Kammer wurde ebenfalls mit 0.01 M H_3PO_4 gefüllt.
Die Elektrophorese bei 500 V dauerte 3-4 Std., mit der Kathode in der unteren Kammer und der Anode in der oberen Kammer. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele

aus den Röhrchen herausgepreßt und in eine Färbelösung (7 % Essigsäure, 50 % Methanol, 0.2 % Bromphenolblau) gegeben. Die Färbung erfolgte für 12 Std. bei Raumtemperatur.
Zur Entfärbung der Gele wurden die Gele in 7 % Essigsäure, 5 % Methanol gegeben. Da die Färbung unter diesen Umständen nur bedingt haltbar war, wurde die Entfärbung nur soweit fortgeführt, bis die Proteinbanden sich deutlich von dem entfärbten, aber noch gelben Gelhintergrund abzeichneten.

2.2.4. Zentrifugationsläufe mit der analytischen Ultrazentrifuge

Die analytischen Ultrazentrifugationsläufe wurden in einer Beckmann-Spinco-Ultrazentrifuge (Modell E) mit dem 2-Lochrotor An-HTi gefahren. Die Ultrazentrifuge war mit einer Temperaturkontrolleinrichtung und einer elektronischen Geschwindigkeitskontrolle ausgerüstet. Bis zu einer Umdrehungszahl von 48000 UpM wurden Aktivkohle gefüllte Epon-Mittelstücke, darüber Aluminium-Mittelstücke eingesetzt. Für die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurden Doppelsektorzellen (12 mm) benutzt, für Gleichgewichtsläufe wurde ein Sechs-Kanal-Zelltyp verwendet. Die Verteilung der Proteinkonzentration über die Zellenlänge wurde mit einem photoelektrischen Scanner bei einer Wellenlänge von 280 mm aufgezeichnet. Die Meßtemperatur betrug 20 ^{o}C.

2.2.4.1. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten

Für die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten des Troponinkomplexes bei den Bedingungen: 1mM EGTA, 10 mM Mg^{2+} und 2 mM Ca^{2+} wurden Proteinproben mit einer Proteinkonzentration zwischen 0.5 und 8 mg/mL gegen die entsprechenden Pufferlösungen (0.5 M KCl, 50 mM Tris oder MOPS, pH 7.2, 1 mM DTE, $\pm$ Metallionen) für mindestens 12 Std. dialysiert. Unmittelbar vor Beginn des Ultrazentrifugationslaufes wurde ein Aliquot der

Lösung zur Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.8.) entnommen. Mit Erreichen der vorgegebenen max. Drehzahl wurden im Abstand von 8 oder 16 Min. das Absorptionsprofil der Zelle abgefahren.

2.2.4.2. Auswertung der Sedimentationsläufe

Nach der Gleichung:

$$S = \frac{2.303}{60 \cdot \omega^2} \cdot \frac{d\log x}{dt} \qquad (1)$$

konnten die Sedimentationskoeffizienten aus einer Auftragung des Logarithmus der Wanderungsstrecke x der Protein-Lösungsmittel-Grenzschicht gegen die Zeit berechnet werden. Die Auswertung wurde mittels eines Fortranprogrammes durchgeführt (Jahnke, 1981). Das Programm berechnete die einzelnen Werte für S zwischen je zwei Zeitintervallen, um systematische Fehler aufzuzeigen. Durch eine Regressionsanalyse der lnx/t-Auftragung wurde der S-Wert für diesen Sedimentationslauf ermittelt.
Die Korrektur der erhaltenen S-Werte auf die Standardbedingungen wurde nach folgender Gleichung durchgeführt:

$$S_{20,W} = S \cdot \frac{\eta_{H_2O,t}}{\eta_{H_2O,20^oC}} \cdot \frac{\eta_{Lösung}}{\eta_{H_2O}} \cdot \frac{(1-\bar{v} \cdot \rho_{H_2O,20^oC})}{(1-\bar{v} \cdot \rho_{Lösung,t})} \qquad (2)$$

Da die Messungen bei 20 °C durchgeführt wurden, konnte eine Temperaturkorrektur unterbleiben. Die Dichte der reinen Pufferlösungen wurde pyknometrisch bestimmt. Die Dichtekorrektur für die Proteinlösungen wurde nach $\rho = \rho_0(1+\bar{v}c)$ durchgeführt. Für die Dichte des Wassers bei 20 °C wurde ein Wert von 0.9982 g/mL eingesetzt (Handbook of Chemistry and Physics, 1974). Die Viskosität der Puffer- und Proteinlösungen wurde in einem KPG-Ubbelohde-Viskosimeter (nach 2.2.5.) bestimmt. Das part. spez. Volumen des Troponins wurde aus seiner Aminosäurezusammensetzung berechnet (Cohn und Edsall, 1943).

2.2.4.3. Gleichgewichtsläufe

Für die Bestimmung des Molekulargewichtes des Troponinkomplexes mittels eines Gleichgewichtslaufes wurden Proteinproben in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.4 und 1.0 mg/ml eingesetzt. Die Proben wurden mindestens 24 Std. durch Dialyse gegen den Puffer äquilibriert, der als Referenzlösung diente. Die Proben wurden vor den Ultrazentifugationsläufen durch Zentrifugation für 20 Min. bei 50000 xg von Staubteilchen und denaturiertem Material getrennt.

Die Gleichgewichtseinstellung erfolgte in 36-48 Std. bei ca. 10000 UpM, wobei die Einstellung des Gleichgewichtes mehrfach kontrolliert wurde.

2.2.4.4. Auswertung der Gleichgewichtsläufe

Nach Einstellung des Sedimentationsgleichgewichtes wurden mehrere Scans der Konzentrationsverteilung des Proteins durch einen photoelektrischen Scanner bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet.
Aus der Auftragung des Logarithmus der Extinktion gegen das Quadrat des Abstandes vom Rotationsmittelpunkt konnte das Molekulargewicht bestimmt werden, wenn man in die folgende Gleichung

$$MG = \frac{2RT \cdot 2.303}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2} \cdot \frac{d \log E}{dx^2} \qquad (3)$$

die Steigung der Geraden aus der obigen Auftragung einsetzte (R ist die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, $\bar{v}$ das partielle spezifische Volumen, ρ die Dichte der Lösung, ω die Winkelgeschwindigkeit, E die Extinktion der Lösung bei einem Abstand r vom Rotationsmittelpunkt).
Für die Berechnung des Molekulargewichtes stand ein Fortran-Programm zur Verfügung; bei Abweichungen der log E/r^2-Auftragung von der Linearität konnten damit eine Analyse des Sedimentationsprofils nach nieder- und höhermolekularen Bestandteilen (nach Yphantis, 1964) durchgeführt werden.

2.2.5. Angaben zur Bestimmung der Viskosität der Troponinproben und der Pufferlösungen

Die Viskositätsbestimmungen der verschiedenen Troponinlösungen wurden in einem KPG-Ubbelohde-Viskosimeter mit einem Kapillaren-Durchmesser von 0.32 mm und einer Viskosimeter-Konstanten von 0.01 bei 20 $\pm$ 0.01 °C durchgeführt. Es wurden, ausgehend von einer konzentrierten Proteinstammlösung, Proteinlösungen im Konzentrationsbereich von 0.25 - 8 mg/mL mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 2.5 mL hergestellt. Durch 24-stündige Dialyse im Kühlraum wurden die Proben mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert. Vor dem Einsatz der Proben im Viskosimeter wurden sie durch Zentrifugation von Flusen und denaturiertem Protein gereinigt. 2 mL der Proben wurden in das Viskosimeter gegeben. Die Messung wurde nach Temperaturausgleich gestartet. Die mehrfach wiederholte Zeitmessung für den Durchfluß des Probenvolumens erfolgte mit einem Viskotimer von Schott.
Die Meßdaten wurden gemäß der Gleichung

$$(t - t_o)/t_o \cdot c = [\eta]_u + k [\eta]_u^2 c \qquad (4)$$

ausgewertet, indem der Term $(t-t_o)/t_o \cdot c$ gegen die Proteinkonzentration der eingesetzten Proteinlösung aufgetragen wurde. Der aus der Regressionsanalyse ermittelte Wert $[\eta]_u$ wurde für die Dichtekorrektur zwischen Lösungsmittel und Proteinlösung nach der Beziehung:

$$[\eta] = [\eta]_u + \frac{1-\bar{v}_{Protein} \cdot \varrho_o}{\varrho_o} \qquad (5)$$

in die intrinsische Viskosität $[\eta]$ umgerechnet.

2.2.6. Eichung einer 1.5/83 Sephacryl S 300 Säule für die Bestimmung des Stokesschen Radius des Troponinkomplexes

Eine 1.5/83 cm Glassäule, die mit Sephacryl S 300 gepackt war, wurde zu Bestimmung des Stokesschen Radius des Troponin-Komplexes eingesetzt. Die Pufferbedingungen (0.5 M KCl, 50 mM MOPS, pH 7.2, 1 mM DTE) waren identisch mit denen der übrigen hydrodynamischen Messungen und den NMR-Messungen; die Messungen wurden bei Raumtemperatur ($20^{o} \pm 2\ ^{o}C$) durchgeführt. Die Sephacryl S 300 Säule wurde unter den jeweiligen Bedingungen (1 mM EGTA,; 10 mM $MgCl_2$; 2 mM $CaCl_2$) mit Hilfe des folgenden Gelfiltrationsstandards geeicht (s. Byers und Kay, 1982):
Ferritin (61 Å); Katalase (52 Å); Aldolase (48.1 Å); Rinderserumalbumin (35.0 Å); Hühnerserumalbumin (28.4; 30.5 Å); Chymotrypsinogen (20.9; 21.9 Å); Cytrochrom C (17.2 Å); Myoglobin (19.8 Å).
Das Ausschlußvolumen wurde durch Dextranblau, das Totalvolumen mit $K_2Cr_2O_7$ ermittelt. Jeweils 4 der aufgeführten Proteine wurden zusammen in 0.5 mL des entsprechenden Puffers auf die Säule aufgetragen. Der Verteilungskoeffizient wurde nach der Beziehung:

$$\sigma = V_e - V_o/(V_t - V_o) \quad \text{mit} \quad V_e = \text{Elutionsvolumen des Proteins}$$

$$V_o = \text{Ausschlußvolumen}$$

$$V_t = \text{Totalvolumen}$$

Abbildung 18 gibt die Eichgerade für diese Sephacryl-S 300 Säule wieder; im halblogarithmischen Maßstab ist der (log) Stokessche Radius der Eichproteine gegen ihren Verteilungskoeffizienten aufgetragen.
Es zeigte sich, daß für die jeweiligen, unterschiedlichen Metallionenbedingungen keine (oder nur geringfügige) Verschiebungen der Elutionsvolumina der Eichproteine festzustellen war. Für die Bestimmung des Elutionsvolumens des Troponins wurde deshalb nur eine gemeinsame Eichkurve verwendet.

2.2.7. Angaben zur Aufnahme der ^{31}P-NMR-Spektren

^{31}P-NMR-Fourier-transformierte Spektren wurden mit den supraleitenden Spektrometern WH-180 "wide-bore" bei 72.86 MHz oder WH-250 bei 101.257 MHz der Firma Bruker-Physik AG aufgenommen.

(a) Aufnahme der NMR-Spektren mit dem Bruker WH-180-Spektrometer (in Würzburg, Institut für Physiologische Chemie)

Für dieses Spektrometer betrug das Probevolumen 12 mL in 20 mm weiten Probenröhrchen. Ein konzentrisch eingesetztes 5 mm NMR-Röhrchen, das mit D_2O gefüllt war, diente als Feld/Frequenz-Deuteriumlock. Alle Spektren wurden mit Breitband ^{1}H-Entkopplung (0.4 W = 500 Hz Bandbreite) gemessen. Die Pulsbreite betrug 25 µsec (= 50°). Routinemäßig wurden vor der Fouriertransformation eine Exponentialmultiplikation durchgeführt, die zu einer Linienverbreiterung von 10 bzw. 5 Hz führte; bei der Angabe der Linienbreiten wurde dieser Effekt berücksichtigt. Die chemische Verschiebung wurde relativ zu einem externen Standard von 85 %iger H_3PO_4 angegeben. Die Meßtemperatur von 20 °C wurde dadurch erreicht, daß ein trockener kalter Luftstrom durch den Probenkopf des Spektrometers geblasen wurde. Die Aquisitionszeit betrug 0.679 sec, die Repetitionszeit 1.7 sec.
Die Proteinkonzentration der eingesetzten Troponinlösungen lag im Bereich von 5-10 mg/mL. Der Ausgangspuffer hatte die Zusammensetzung: 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, 2.0 mM DTE, 1 mM EGTA, pH 7.2. Gewünschte Konzentrationen der Metallionen Mg^{2+} und Ca^{2+} wurden durch die Zugabe entsprechender Aliquote einer 0.5 M Salzlösung ($MgCl_2$ oder $CaCl_2$) im gleichen Puffer erreicht. pH-Konstanz wurde durch Messung vor und nach dem Aufzeichnen der NMR-Spektren überprüft und der pH-Wert gegebenenfalls nachgestellt.

(b) Aufnahme der NMR-Spektren mit dem Bruker WH-250-Spektrometer (Lehrstuhl f. Anorg. Chemie II, Ruhr-Uni Bochum)

Messungen an diesem Gerät wurden in 10 mm weiten Probenröhrchen mit insgesamt 2.5 mL Probenvolumen durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 25 mg/mL. Die Proben waren in 95 % D_2O gelöst. Die Pufferkonzentration war identisch mit der unter (a) angegebenen; die Angabe des pH-Wertes ist für den D_2O-Puffer nicht korrigiert.
Temperaturkonstanz ($20^o \pm 1\ ^oC$) wurde durch das Arbeiten in einem thermostatisierten Raum erreicht. Die durch exponentielle Multiplikation hervorgerufene Linienverbreiterung betrug zwischen 1-5 Hz. Die Sweep-Weite betrug 1200 Hz bei einer Repetitionszeit von 4.8 bzw. 3.4 sec.
Die Anzahl der Scans ist bei den jeweiligen Spektren angegeben.

2.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (1951)

Die Durchführung des Tests erfolgte in einem Technicon-Auto-Analyser bei 20 °C. Die Eichung erfolgte mit Rinderserumalbumin Standardlösungen (30, 60, 90 und 120 µg/mL).

2.2.9. Angaben zur Radioaktivitätsmessung

Die Bestimmung der Strahlungsintensität radioaktiver Proben wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard, Modell 2450) in folgenden Szintillationslösungen durchgeführt:

(a) für wasserfreie Proben:
Szintillator auf Toluol-Basis, 24 g Permablend (21.84 g 2,5-Diphenyloxazol + 2.16 g 1,4-Di-(2-methylstyryl)-Benzol) in 2.0 L Toluol

(b) für wässrige Proben:
Szintillator auf Naphthalin-Dioxan-Basis, 24 g Permablend (21.84 g Diphenyloxazol + 2.16 g 1,4-Di-(2-methylstyryl)-Benzol, 375 g Naphthalin in 3.0 L wasserfreiem Dioxan.

2.2.10. Bestimmung des ^{32}P-Phosphateinbaues in Proteine nach Mans und Novell (1961)

Aliquote eines Reaktionsansatzes zur Proteinphosphorylierung wurden zu definierten Zeiten aus dem Inkubationsansatz entnommen und auf ein Glasfaserplättchen (Whatman GF/C, Ø 2.5 cm) pipetiert. Die Plättchen wurden sofort in 10 % TCA-Lösung, 1 % $Na_4P_2O_7$, 1 % K_2HPO_4 gegeben. Dabei präzipitierte das Protein und wurde an den Glasfasern festgehalten, nicht präzipitierbares Material wurde von dem Plättchen abgewaschen. Die Plättchen blieben für 15-20 Min. in dieser Lösung; danach wurden sie für 5 Min. in eine frische Lösung gleicher Zusammensetzung gegeben, anschließend zweimal in 10 %ige TCA-Lösung, zweimal für 5 Min. in Wasser und zum Schluß in Aceton. Die Plättchen wurden anschließend für 15 Min. bei 50 ^{o}C getrocknet. Sie wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit je 5 mL der Toluol-Szintillatorlösung versetzt. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Reaktionsansatz wurde ein nichtgewaschenes Plättchen direkt eingesetzt.

2.2.11. Lokalisation des ^{32}P-Phosphateinbaus in den phosphorylierten Proteinen

Aliquote der nach 2.1.8. phosphorylierten Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.1.) in ihre Untereinheiten aufgetrennt. Das Gel wurde in einem Gilson 'GF' Gelfraktionator aus seinem Röhrchen herausgepreßt und in 1 mm dicke Abschnitte geschnitten und zerkleinert. Jeder Abschnitt wurde mit 5 mL Szintillatorlösung auf Naphthalin-Dioxan-Basis (2.2.9.) versetzt und im Szintillationszähler die in diesem Abschnitt vorhandene Radioaktivität bestimmt. Durch Vergleich der Radioaktivitätsmaxima mit durch Coomassie Brilliant Blue angefärbten Proteinbanden auf parallel dazu nach 2.2.3.3. behandelten Gelen konnte der Phosphateinbau den entsprechenden Untereinheiten des Proteins zugeordnet werden.

2.2.12. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Troponins

Das Troponin und seine Untereinheiten (gelöst in 1 M NH_4CO_3) wurde gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Proben in 6 NHCl bei 110 °C im Ofen hydrolysiert (12, 24, 48 und 72 Std.). Die anschließende Auftrennung des Aminoräuregemisches und die quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte in einem automatischen Aminosäureanalysator (Biotronik Serie 6000). Zur Auftrennung wurde eine Ionenaustauschsäule (Durrum, DC 6 A, 0.6 cm x 27 cm Harzhöhe) benutzt. Die Elution der Aminosäuren erfolgte mit Trilithium-Citrat-Puffern steigenden pH-Wertes (s.u.) sowie durch schrittweise Erhöhung der Säulentemperatur von 37 auf 65 °C. Die quantitative Bestimmung erfolgte nach Zusatz von Ninhydrin-Reagenz im Durchflußphotometer bei 440 und 510 nm. Die Fläche des Extinktionssignals als Maß für die Substanzmenge wurde durch automatische Integration oder durch Planimetrie des Schreiberscans ermittelt. Die Eichung erfolgte durch ein Gemisch von Standardaminosäuren.

Folgende Puffer wurden zur Durchführung der Analysen eingesetzt:

Puffer A: 60 mM Li_3-Citrat/11 mM Phenol/0.001 % Brij/0.01 % n-Propanol, pH 2.80

Puffer B: 60 mM Li_3-Citrat/50 mM LiCl Ø 11 mM Phenol/ 0.001 % Brij/0.01 % n-Propanol, pH 3.10

Puffer C: 60 mM Li_3-Citrat / 170 mM LiCl / 11 mM Phenol / 0.001 % Brij, pH 3.36

Puffer D: 60 mM Li_3-Citrat / 219 mM LiCl / 11 mM Phenol / 0.001 % Brij, pH 4.00

Puffer E: 60 mM Li_3-Citrat / 1.47 M LiCl / 11 mM Phenol / 0.001 % Brij, pH 3.3

Der Puffer A diente gleichzeitig als Probenauftragspuffer. Bei dieser Methode wurden die Aminosäuren Tryptophan und Cystein nicht erfaßt, da beide bei der sauren Hydrolyse zerstört wurden. Aus dem gleichen Grund konnten phosphorylierte Aminosäuren mit dieser Methode nicht bestimmt werden.

2.2.13. Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10 %ige Polyacrylamid-Gele, die nach dem Verfahren von Weber und Osborn hergestellt und benutzt wurden (s. 2.2.3.1.), wurden mit Proben beladen, die die folgenden Proteine als Eich- bzw. Bestimmungssubstanzen enthielten:

HMM (heavy meromyosin)	MG: 150000 D
Phosphorylase b	94000 D
Rinderserumalbumin	66000 D
Katalase	60000 D (Untereinheit)
Hühnerserumalbumin	44000 D
Aldolase	40000 D (Untereinheit)
Chymotrypsinogen	26000 D
Ferritin	18500 D (Untereinheit)
Myoglobin	17000 D
Cytochrom C	12500 D
Troponin T, I, C	MG: zu bestimmen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele nach dem üblichen Verfahren ge- und entfärbt (2.2.3.1.). Die Gele wurden nach 2.2.3.2. densitometriert. Aus den Scan-Diagrammen wurde die Gesamtlaufstrecke der Salzfront (Dye-Front) und die Wanderungsstrecke des Proteins am Maximum der Proteinbande bestimmt. Die Wanderungsstrecke der Eichproteine wurde in Prozent der Maximalwanderungsstrecke der Salzfront ausgedrückt und als Abszisse gegen eine Ordinate mit dem Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen. Aus dem linearen mittleren Bereich (nur HMM als sehr großes, langgetrecktes Molekül und Cytochrom C weichen deutlich von diesem Verlauf ab) konnten die apparenten Molekulargewichte der Troponin-Untereinheiten T, I und C entnommen werden.

3. Ergebnisse

3.1. Präparationsmethode

Die von Tsukui und Ebashi (1973) beschriebene Methode erlaubt, in 7-8 Std. Troponin anzureichern, das als Ausgangssubstanz für eine weitere Reinigung dienen kann.
Aufgrund hoher proteolytischer Aktivität im Muskelhomogenat (Waxman, 1978; Hara et al., 1983), die immer wieder als störender Faktor bei der Troponinpräparation beschrieben worden ist (Sperling et al. 1979; Holroyde et al. 1980), ist man gezwungen, dem Zeitfaktor eine besondere Aufmerksamkeit zu schenken.
Nach einer (teilweisen) Myosinextraktion mit Hilfe der Guba-Straub-Lösung erfolgt eine 0.4 M LiCl-Extraktion der myofibrillären Proteine mit gleichzeitiger isoelektrischer Präzipitation des Myosins bei pH 5.1 . Nach Abtrennung des Muskelrestes durch Zentrifugation wird im Überstand durch Ammoniumsulfatfällung zwischen 22 und 28 g $(NH_4)_2SO_4$/100 ml das Herzmuskel-Troponin ausgefällt. Dieses Reinigungsverfahren erbringt in der vorliegenden Ausarbeitung eine Anreicherung des Troponins im Vergleich zu der Ausgangsextraktionslösung um den Faktor 2-4 und eine Abtrennung vom Tropomyosin (Überstand der 45 %-Fällung, s. Tabelle 1). Das Material ist aber noch mit Myosin, Aktin und anderen höhermolekularen Proteinen verunreinigt.
Der von Tsukui und Ebashi verwendete LiCl-Waschungsschritt (vor dem 0.4 M LiCl-Extraktionsschritt) wurde ausgelassen, da er zu einem großen Verlust an Troponin führt. Die untere Ammoniumsulfat-Fällungsgrenze wurde im Vergleich zu dem vorgegebenen Verfahren verringert, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Herabsetzung der Fällungsgrenze auf 19 g/100 mL (= 30 % Sättigung) führt zwar zu einer Erhöhung des Myosin- und Aktinanteils, allerdings können diese Proteine zu einem späteren Zeitpunkt spezifisch entfernt werden.
Eine Erniedrigung des pH-Wertes während der isoelektrischen Präzipitation erwies sich nicht als sinnvoll; das Herzmuskel-Troponin wird, anders als im Fall des Skelettmuskel-Troponins,

zusammen mit dem Tropomyosin bei einem pH-Wert unter 4.8 ausgefällt.
Um die proteolytische Aktivität der Rohtroponin-Lösung abzutrennen, war auch versucht worden, das von Sperling et al. (1979) beschriebene Verfahren einer Casein-Sepharose-Chromatographie für das Herzmuskel-Troponin anzuwenden. Die Abtrennung gelang nicht, da Troponin und Proteasen gemeinsam von der Casein-Sepharose-Säule eluieren. Dies beruht wahrscheinlich auf dem unterschiedlichen Ammoniumsulfatfällungsbereich für diese beiden Troponine. Skelettmuskel-Troponin eluiert schon bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von der Casein-Sepharose-Säule, bei der das Herzmuskel-Troponin noch daran adsorbiert bleibt. Bei niedrigerer Ammoniumsulfatkonzentration desorbieren auch die Proteasen, so daß keine Reinigung erzielt werden kann.
Myosin kann durch Dialyse der Rohtroponin-Lösung für mindestens 8-12 Std. gegen 20 mM Tris, pH 7.5, 15 mM ME unter mehrmaligem Wechsel des Puffers präzipitiert werden. Das Präzipitat läßt sich leicht abzentrifugieren. Mitpräzipitation assoziierten Troponins führt zu einem Verlust an Troponin; die lange Dialysezeit und die Anwesenheit des Protease-Aktivators Mercaptoethanol fördert aber die Degradation. Die Entstehung bzw. Intensivierung mehrerer Proteinbanden, 35000, 32000, 23000 und 14000 D, auf SDS-Gelen weisen eine Degradation des Troponins nach.
Aktin konnte weder durch Gelfiltration über Sepharose Cl-4B noch Sephacryl S 300 abgetrennt werden. 200 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$ und 1mM ATP, eingestellt in dem Überstand der Myosinabtrennung (s.o.), der noch stark mit Aktin verunreinigt war, führten zu einer Polymerisation des G-Aktins zu langkettigem F-Aktin, das durch Zentrifugation für 1 Std. bei 100000xg sedimentiert werden konnte. Nach Abtrennung befand sich im Überstand als Hauptbestandteil Troponin. Gelfiltration dieses Materials über Sephacryl S 300 führte zu einem hinreichend sauberen, stabilen Troponin.
Analyse des proteingebundenen Phosphatgehaltes ergab, daß so präpariertes Troponin phosphatfrei war (0.1 Mol P/100000 g

Abb. 2: SDS-Gelelektrophorese (nach 2.2.3.1.(b)) von Aliquoten der Reinigungsschritte der Herzmuskel-Troponin-Präparation

Aliquote (5-20 µg/Gel) der in Tab. 1 angegebenen Reinigungsschritte einer Herzmuskel-Troponin-Präparation (nach 2.1.1.) wurden nach 2.2.3.1.(b) über 10 %ige Polyacrylamidgele aufgetrennt:

(1) Überstand der 0.4 LiCl-Extraktion (A1)

(2) Überstand der 0-30 %-$(NH_4)_2SO_4$-Fällung (A2)

(3) Überstand der 30-45 %-$(NH_4)_2SO_4$-Fällung (A3)

(4) Wiederaufnahme des Niederschlages der 30-45 %-$(NH_4)_2SO_4$-Fällung (A4; Rohtroponinlösung)

(5) Überstand der DEAE-Cellulose-Batch-Adsorption des Troponins (A5)

(6) 0.1 M KCl-Stufe der DEAE-Cellulose Chromatographie (A6)

(7) 0.4 M KCl-Stufe der DEAE-Cellulose-Chromatographie (A7) (Aufgabelösung für die Sephacryl-S 300 Säule, Abb. 3)

Protein). Da jedoch phosphathaltiges Troponin Ziel des Präparationsverfahrens sein sollte, wurde der Reinigungsgang weiter modifiziert.
Byers et al. (1979) hatten die Reinigung des Troponins mit gutem Erfolg über eine DEAE-Sephacel-Säule durchgeführt. Um den von Byers et al. beschriebenen Dialyseschritt zur Entfernung des Myosins zu umgehen (Verlängerung der Protease- und Phosphatase-Kontaminationszeit), wurde der Niederschlag der 30-45 % $(NH_4)_2SO_4$-Fällung in Puffer E (10 mM Tris, pH 7.8, 1 mM DTE) (s. Kap. 2.1.1.) so verdünnt wiederaufgenommen, daß die Leitfähigkeit der Lösung < 5 mS ($\hat{=} \sim$ 50 mM KCl) war.

Durch zusätzliche Herabsetzung des pH-Wertes auf 6.5 gelang es so, Myosin zu präzipitieren und durch Zentrifugation für 30 Min. bei 15000xg abzutrennen. Nach der Rejustierung des pH-Wertes auf 7.8 wurde das Troponin in einem Batch-Verfahren an die DEAE-Cellulose gebunden. Durch eine 0.1 M KCl-Stufe (in Puffer E, s.o.) wurden Rest-Aktinverunreinigungen ausgewaschen. Das Troponin konnte danach entweder durch einen Salzgradienten von 0.1 - 0.5 M KCl oder mit einer Salzstufe von 0.4 M KCl in Puffer E eluiert werden.
Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in einer drastischen Verkürzung der Zeit, in der das Troponin in einer Lösung hoher Proteinkonzentration und großer Protease- und Phosphataseaktivität enthalten ist. Die DEAE-Cellulose Chromatographie erweist sich als erfolgreich in der Abtrennung des Aktins sowie von Troponin-Komplex-Fragmenten, die mit der 0.1 M KCl-Stufe eluiert werden.
Der Troponin-Komplex ist an dieser Stelle des Reinigungsverfahrens frei von Proteasen; Inkubation bis zu 5 Std. bei 30 °C bei verschiedenen pH-Werten (5.1, 7.0, 8.0) und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mg^{2+} und Ca^{2+} lassen das Bandenmuster auf SDS-Gelen unverändert.
Tests auf Phosphatase-Aktivität zeigten jedoch, daß zumindest eine im alkalischen aktive, Mn^{2+}-stimulierbare Phosphatase noch nicht abgetrennt war. Später beschriebene ^{31}P-NMR-Messungen mit Troponin dieser Reinigungsstufe zeigen bei Zusatz von Mg^{2+} eine deutliche Verringerung der Phosphoserin-

Tabelle 1: Reinigungstabelle für Troponin aus Rinderherzmuskel, das nach dem in Kap. 3.1.1. beschriebenen Verfahren präpariert wurde

Aliquot Nr.[a]	Vol. des Aliquotes (mL)	Proteinkonzentr. (mg/mL)	%-Anteil des Tn[b],[c]	max. mögl. Tn[b] Ausbeute (mg)	Reinigungsausbeute
A1	4100	0.86	22.5	796	100
A2	4500	0.56	26.1	661	83
A3	4600	0.40	--	--	
A4	690	1.90	73.2	549	69
A5	800	0.41	--	--	
A6	500	0.23	--	--	
A7	52	7.69	92.6	391	49
A8[d]	285	9.68		247	31

[a] s. Kap. 3.1.1. und Legende zu Abb. 2;

[b] Tn = Troponin;

[c] nach Kap. 2.2.3.2. an Hand der in Abb. 2 gezeigten SDS-Gele bestimmt;

[d] vereinigte und konzentrierte Fraktionen des Sephacryl S 300 Säulenlaufes (Abb. 3)

Tabelle 2: Endogene Phosphatase-Aktivitäten in den Lösungen der Herzmuskel-Troponinpräparation

Aliquote-Nr.[a]	alk. Phosphatase Aktivität [b] (mU/mL)	ΣmU[d]	saure Phosphatase Aktivität [c] (mU/mL)	ΣmU
A1	2.53	10373	9.10	37310
A2			5.53	24885
A3			3.67	16883
A4	6.21	4285	7.86	5423
A5	1.78	1426	5.24	4190
A6	1.24	621	1.45	724
A7	19.33	1005	1.24	65

[a] s. Kap. 3.1.1. und Legende zu Abb. 2;

[b] bestimmt nach Kap. 2.2.1.(a);

[c] bestimmt nach Kap. 2.2.1.(b);

[d] $1\ U = 1\ mMol \times min^{-1} \times mL^{-1}$

Signale bei gleichzeitigem Auftreten eines Signals für freies anorganisches Phosphat.
Eine Abtrennung der kontaminierenden Phosphatase war durch Gelfiltration über Sephacryl S 300 möglich (s. Abb. 3), wenn auch eine Überlappung mit dem zuvor eluierenden Troponin-Gipfel bei hoher Proteinbeladung zu beobachten war. Rechromatographie und entsprechende Fraktionierung führte zu Troponin, das sowohl frei von endogener Protease- als auch Phosphatase-Aktivität war.
Neben der alkalischen Phosphatase-Aktivität war auch eine im sauren aktive Phosphatase in den Lösungen der Troponin-Präparation nachgewiesen worden (s. Tab. 2). Um die beachtlichen Phosphatase-Aktivitäten während der Präparation auszuschalten, wurden Phosphatase-Hemmstoffe zugefügt. Die saure Phosphatase-Aktivität wurde durch 50 bzw. 25 mM Fluorid (s. 2.1.1.) inhibiert. Da die alkalische Phosphatase Mn^{2+} zur Aktivitätsexpression benötigt, wurden zur Inaktivierung sämtliche Präparationsschritte mit 5 bzw. 1 mM EDTA durchgeführt.
Aus Tabelle 2 ist zu ersehen, daß die saure Phosphatase-Aktivität nach der DEAE-Cellulose Chromatographie fast vollständig vom Troponin abgetrennt ist, während von der alkalischen Phosphatase-Aktivität etwa 30 % der Aktivität der Rohtroponin-Lösung gemeinsam mit dem Troponin von der DEAE-Cellulose desorbiert werden. Die Gelfiltration über Sephacryl S 300 bringt die endgültige Reinigung (s.o.). Die Inaktivierung der Phosphatasen während der Präparation zeigt sich in dem erhöhten proteingebundenen Phosphatgehalt.
An Hand der Tabellen 1 und 2 läßt sich die Reinigung des Herzmuskel-Troponins und die Abtrennung der endogenen Phosphatasen verfolgen.
Die Ermittlung der apparenten Molekulargewichte der Troponin-Untereinheiten mittels SDS-Gelelektrophorese (Abb. 4) ergibt 42000 D für die TnT-, 27500 D für die TnI- und 19800 D für die TnC-Untereinheit. Eine regelmäßig zu beobachtende schwache Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 23500 D ist ein Degradationsprodukt der (intakten) TnI-Untereinheit.

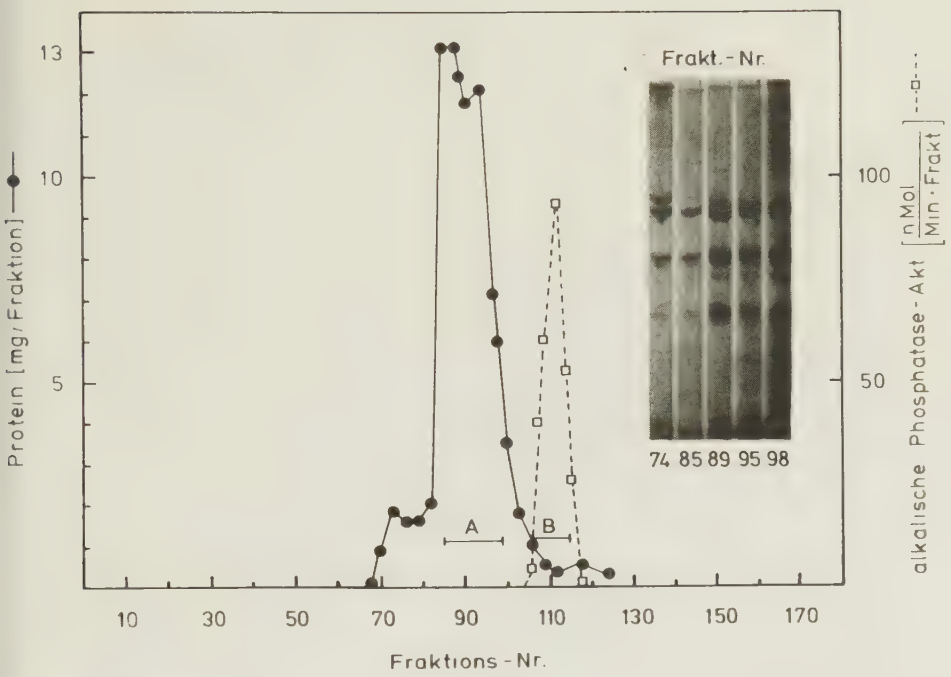


Abb. 3: Gelfiltration über Sephacryl S 300

Das Protein der 0.4 M KCl-Stufe der DEAE-Cellulose Chromatographie (Aliquot A7, s. Tab. 1) wurde in maximal 50 mL 0.5 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.2, 0.1 mM EDTA, 15 mM ME auf eine Sephacryl S 300 Säule (5/90) aufgetragen, die im gleichen Puffer äquilibriert war. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 96 mL/h, es wurden 8.6 mL Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden nach 2.2.8. auf Protein getestet und nach 2.2.1. (a) und (b) auf Phosphatase-Aktivität.
In der Abbildung ist die Proteinmenge und die alkalische Phosphatase-Aktivität dargestellt; saure Phsophatase-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Die mit A und B gekennzeichneten Fraktionen wurden getrennt vereinigt und nach 2.1.1. und 2.1.4.(a) aufgearbeitet. Durch 10 %ige Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach 2.2.3.1.(b)) wurde der Bereich der Elution des homogenen Troponins bestimmt.

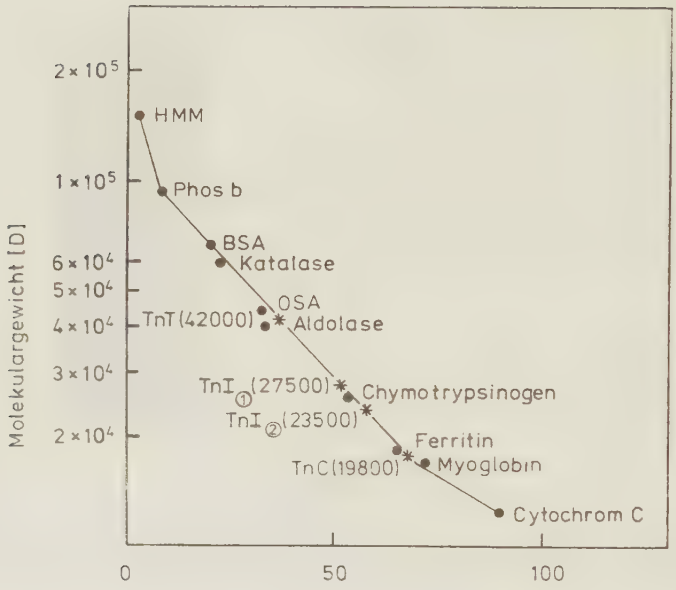


Abb. 4: Bestimmung der apparenten Molekulargewichte der Untereinheiten des Troponins mittels SDS-Gelelektrophorese

Die Bestimmung der Eichgeraden war nach 2.2.13. erfolgt. Herzmuskel-Troponin-Proben wurden in der gleichen Weise wie die Standardproteine behandelt. Nach der Bestimmung der R_f-Werte für die einzelnen Untereinheiten konnten die in der Abbildung angegebenen apparenten Molekulargewichte bestimmt werden. Mit TnI_1 und TnI_2 sind die zwei für die TnI-Untereinheit beobachtbaren Banden gekennzeichnet; TnI_2 stellt ein Proteolyseprodukt der intakten TnI-Untereinheit dar. Die apparent höheren Molekulargewichte der Untereinheiten im Vergleich zu den Werten aus der Aminosäurezusammensetzung sind bekannt (Tsukui und Ebashi, 1973; Brekke und Greaser, 1976; Stull und Buss, 1977).

3.2. Präparation des Tropomyosins unter Phosphatase-inhibierenden Bedingungen

Der Überstand der 30-45 % $(NH_4)_2SO_4$-Fällung aus der Troponinpräparation (s. 2.1.1.) stellt eine Tropomyosin-angereicherte Fraktion dar. Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, verbleiben im Überstand der 45 %-Fällung (Aliquot A3) sowohl alkalische wie auch saure Phosphatase-Aktivität.
Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Präparation des Tropomyosins wurde wie beim Troponin besonders darauf geachtet, die vorhandenen Phosphatase-Aktivitäten während des gesamten Präparationsverfahrens inaktiv zu halten.
Tropomyosin wurde durch Fällung bei 70 % - $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung und Zentrifugation für 1 Std. bei 15000xg konzentriert. Der Tropomyosin-Niederschlag wurde in 1 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM KF, 15 mM ME wiederaufgenommen; erneut wurde eine fraktionierte $(NH_4)_2SO_4$-Fällung durchgeführt, die Fraktion zwischen 45 % und 60 % wurde in wenig 0.5 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 25 mM KF, 1 mM DTE wiederaufgenommen. Zur Abtrennung der Phosphatasen wurde eine Gelfiltration über eine Sephacryl S 300-Säule (5/65), äquilibriert im obigen Puffer,durchgeführt.
In den Fraktionen des Säulenlaufes konnte keine Phosphatase-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Die tropomyosinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt. SDS-Gelelektrophorese zeigt, daß es sich um einheitliches Material handelte. Nur eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 39000 D ist zu sehen (Abb. 5, (4) u. (5)). Die Analyse ergibt, daß das so präparierte Tropomyosin 0.2 Mol P/Mol Tropomyosin (66000 D) enthält.

3.3. Auftrennung des Herzmuskeltroponins in seine Untereinheiten

Um ein schnelles, einfaches Verfahren zu bekommen, mit Hilfe dessen in reproduzierbarer Weise Troponin in kleinen Mengen in seine Untereinheiten aufgetrennt werden konnte, wurde das Präparationsverfahren von Burtnick et al. (1975a,b; 1976)

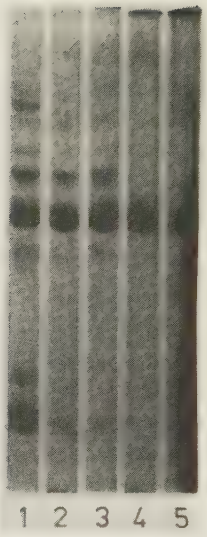


Abb. 5: SDS-Gelelektrophorese der Präparationsaliquote der Tropomyosin-Reinigung

Eine SDS-Gelelektrophorese wurde nach 2.2.3.1.(b) auf 10 %igen Polyacrylamid-Gelen durchgeführt.

(1) Überstand der 30-45 %-$(NH_4)_2SO_4$-Fällung

(2) Tropomyosinlösung, nach 45-70 %-$(NH_4)_2SO_4$-Fällung und Wiederaufnahme in 1 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM KF, 15 mM ME

(3) Wiederaufnahme des 45-60 %-$(NH_4)_2SO_4$-Niederschlages nach erneuter $(NH_4)_2SO_4$-Fällung

(4) und (5) Fraktionen des Sephacryl S 300 Laufes

als eine 1-Säulen-Chromatographie auf DEAE-Sephadex A 25 entwickelt (Kap. 2.1.2.). Als Ausgangssubstanz wurde homogenes Troponinmaterial (Reinigungsschritt 8, s. Tabelle 1) eingesetzt, so daß weitere Reinigungsschritte nach der Auftrennung unterbleiben konnten. Die Auftrennung erfolgte in 3 Stufen (s. Abb. 6).
Im Durchlauf konnte die nicht absorbierte TnI-Untereinheit isoliert werden. Nach Waschen der Säule mit 50 mM KCl enthaltendem Puffer wurde mit 250 mM KCl die TnT-Untereinheit eluiert. Neben 8 M Harnstoff war diese hohe Salzkonzentration notwendig, um die schlecht lösliche TnT-Untereinheit von der Säule zu eluieren.
1 mM EDTA war dem Harnstoff-Puffer zugesetzt worden, um eine vollständige Dissoziation der TnC-Untereinheit von den beiden anderen Untereinheiten zu erzielen. Die TnC-Untereinheit wurde nach der Elution der TnT-Untereinheit durch eine 0.4 M KCl-Stufe im gleichen Puffer von der Säule desorbiert. Bis auf die TnC-Untereinheit waren die einzelnen Fraktionen homogen; die TnC-Untereinheit konnte durch Rechromatographie im Harnstoff oder auch in nicht denaturierendem Medium weiter gereinigt werden.
In Tabelle 3 ist für mehrere Präparationen die bei der Auftrennung in die Untereinheiten isolierte TnI-Menge angegeben; ferner sind die berechneten Mengen bei einer TIC- und TI_2C-Stöchiometrie angegeben, bezogen auf die eingesetzte Menge an Troponin. Sie ermöglicht eine Abschätzung des Mengenverhältnisses der Untereinheit zum Gesamtkomplex und damit eine Abschätzung der Stöchiometrie des untersuchten Komplexes.

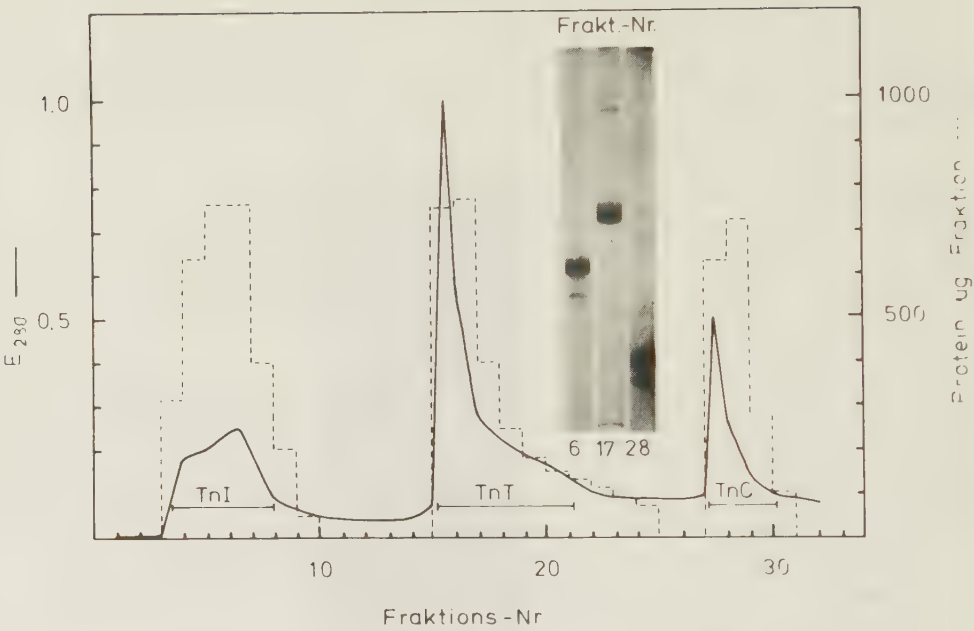


Abb. 6: Auftrennung des Troponins in seine Untereinheiten durch Austauscherchromatographie in 8 M Harnstoff

Troponin (7.8 mg/4 mL) gelöst in 8 M Harnstoff, 20 mM Tris, pH 7.8, 1 mM EDTA, 15 mM ME wurden auf eine 0.8/10 cm DEAE-Sephadex-A25 Säule aufgetragen (4 mL/h), die im gleichen Puffer äquilibriert war. Nach Aufgabe der Probe wurde die Säule mit 50 mM KCl im gleichen Puffer gewaschen. Nachdem die Extinktion auf den Ausgangswert zurückgegangen war, wurde die Säule mit 0.25 M KCl eluiert. Wenn kein Protein mehr eluiert wurde, wurde die KCl-Konzentration auf 0.4 M erhöht und die TnC-Untereinheit von der Säule desorbiert.
Die Fraktionen wurden wie angegeben vereinigt; als erstes eluierte die TnI-Untereinheit, danach die TnT- und zum Schluß die TnC-Untereinheit, wie durch SDS-Gelelektrophorese (nach 2.2.3.1.(b)) überprüft wurde (s. Einschub).

Tabelle 3: Die nach der Auftrennung in die Untereinheiten erhaltene Menge TnI im Vergleich zu den zu erwartenden TnI-Mengen bei einer TIC- und TI_2C-Stöchiometrie

Präp.-Bezeichnung	TnI (isoliert) (mg)	TnI (TIC) (mg)	TnI(TI_2C) (mg)
R 43_A	2.37	2.40	3.69
R 43_{B1}	2.46	2.40	3.69
R 43_{B2}	3.09	2.40	3.69
R 44	3.96	4.17	6.40
R 45.1	6.99	7.27	11.16
R 45.2	3.39	3.34	5.13
R 48_A	3.03	2.73	4.16
R 48_B	2.69	2.81	4.27

3.4. Aminosäureanalyse des Herzmuskel-Troponins

In Tabelle 4 ist die Aminosäurezusammensetzung des isolierten Herzmuskel-Troponins wiedergegeben. Die im Verlauf dieser Arbeit ermittelten Werte (Spalte 1) stellen die Mittelwerte von 4 Troponin-Präparationen dar. Jede Charge wurde für 16, 24, 48 und 72 Std. in 6 N HCl bei 110 ^{o}C hydrolysiert. Aus einer Auftragung des Aminosäuregehaltes (pro 77500 g Protein) gegen die Hydrolysezeit konnte bei Extrapolation gegen t = o der Wert für den maximalen Gehalt ermittelt werden.
Als Vergleichswerte sind die Aminosäure-Zusammensetzungen des Herzmuskeltroponins angegeben, wie sie von drei anderen Arbeitsgruppen bestimmt wurden. Falls notwendig, wurden die dort angegebenen Werte auf folgende Molekulargewichte für die Untereinheiten umgerechnet:18500 (TnC-Untereinheit), 24000 (TnI-Untereinheit), und 35000 (TnT-Untereinheit). Für die Berechnung der Aminosäurezusammensetzung des Gesamtkomplexes aus diesen Werten wurde eine Stöchiometrie für T:I:C von 1:1:1 angenommen.

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung des Herzmuskel-Troponins (nach 2.2.12.)

	diese Arbeit	Brekke und Grease (1976)	Burtnick et al. (1975,1976)	Lin und Cassim (1978)
Lys	65.8(3.0)	67.4	69.3	64.3
His	8.7(0.3)	8.1	7.2	11.5
Arg	64.8(1.3)	60.4	59.2	57.5
Asp	67.6(2.1)	72.5	72.8	69.4
Thr	25.6(3.5)	25.1	24.2	27.0
Ser	22.1(3.3)	22.8	21.4	27.5
Glu	127.4(3.7)	133.6	143.2	39.7
Pro	25.9(3.3)	22.6	19.8	17.3
Gly	40.5(2.6)	39.0	37.6	41.5
Ala	55.9(3.5)	56.0	55.7	55.3
Val	30.7(0.9)	28.9	28.7	33.6
Met	14.9(3.7)	18.4	18.1	18.4
Ile	29.9(1.2)	27.2	26.9	27.8
Leu	53.1(2.5)	51.3	52.6	51.5
Tyr	10.9(1.5)	10.3	10.4	13.3
Phe	21.1(1.5)	21.0	20.3	22.7
Cys	3.1(0.5)	5.8	5.7	
Trp			3.4	4.7

Eine Tryptophan-Bestimmung wurde nicht durchgeführt.

3.5. Phosphoprotein Troponin

3.5.1. Der proteingebundene Phosphatgehalt des Troponins in Abhängigkeit von der Präparationsmethode

Die Veränderungen in der Präparationsmethode für das Herzmuskel-Troponin, wie sie im Kap. 3.1. dargestellt worden sind, erlaubten es, den Troponin-Komplex mit einem erhöhten proteingebundenen Phosphatgehalt zu präparieren. Die Bestimmung des Phosphatgehaltes erfolgte nach dem in Kap. 2.1.6. beschriebenen Verfahren. Herzmuskel-Troponin, das in Erweiterung der Tsukui/Ebashi-Methode durch zwei Gelfiltrationsverfahren (Sepharose Cl-4B und Sephacryl S 300) gereinigt worden war (Stufe 1 in der Veränderung des Präparationsverfahrens), enthielt zwischen 0.5 und 1.5 Mol P/77500 g Troponin (Tab. 5 (A)).

Im Zuge eines Verbesserungsversuches des Präparationsverfahrens (Stufe 2) war eine längere Dialyse der Rohtroponin-Probe zur Entfernung des Myosins und eine Actin-Polymerisation eingeführt worden (s. Kap.3.1.1.). Derartige Proben enthielten nur 0.05 - 0.1 Mol P/7750 g Protein (Tab. 5 (B)). Dieser starke Abfall des proteingebundenen Phosphates zeigte sich allerdings nur, wenn die Proben unmittelbar im Anschluß an die Präparation ohne vorherige Gelfiltration entsprechend behandelt wurden. Inkubation einer nach dem ersten Verfahren gereinigten Probe unter identischen Bedingungen ergab nur eine geringe Erniedrigung des Phosphatgehaltes (Tab. 5 (C)). Durch die Gelfiltration wurde offensichtlich ein dephosphorylierender Faktor abgetrennt.

Durch Einfügung der DEAE-Austauscher-Chromatographie und Präparation ohne Aktin-Polymerisationsinkubation wurde das Präparationsverfahren zu verbessern versucht (Stufe 3). Es ergab sich Troponin, dessen Phosphatgehalt nur unwesentlich höher lag als bei den oben genannten, mit Aktin-Polymerisation isolierten Proben. (Tab. 5(D)).

Troponin, das unter Phosphatase-inhibierenden Bedingungen (Fluorid, ohne Sephacryl S 300-Gelfiltration) präpariert

Tabelle 5: Abhängigkeit des proteingebundenen Phosphatgehaltes des Herzmuskel-Troponins von der Veränderung der Präparationsmethode [a]

A	Gesamt-troponin Mol P/ 77500 D	B	Gesamt-troponin Mol P/ 77500 D	C	Gesamt-troponin Mol P/ 77500 D	D	Gesamt-troponin Mol P/ 77500 D	E	Gesamt-troponin Mol P/ 77500 D	F	Gesamt-troponin (Mol P/ 77500 D)	TnI-Unter-einheit (Mol P/ 35000 D)	TnI-Unter-einheit (Mol P/ 24000 D)
R 9	1.45	R 23	0.09	(a)	0.71	R 32	0.28	46 [b]	0.88	R 42	1.85	0.80	0.80
R 13	1.12							50	1.15	R 43	2.43	0.54	1.10
R 16	0.77	R 24	0.10	(b)	0.74	R 33	0.33	55	1.40	R 44	2.18	0.59	0.96
R 18	0.54	R 25	0.05	(c)	0.68			60	1.54	R 45	1.76	0.82	0.62
R 19	0.71					R 34	0.30	65	1.68	R 48	1.88	0.54	0.86
				(d)	0.57			70	1.71	R 49	2.59	0.81	0.91

[a] Der proteingebundene Phosphatgehalt wurde nach 2.1.6. bestimmt.

[b] Fraktions-Nr.

(A) Phosphatgehalt verschiedener Proben, die nach dem Tsukui/Ebashi-Verfahren mit zwei anschließenden Gelfiltrationsschritten (Sepharose Cl-4B, Sephacryl S 300) präpariert wurden (Stufe 1, s. 3.5.1.).

(B) Phosphatgehalt verschiedener Proben, bei denen durch Dialyse gegen 1mM $NaHCO_3$-Puffer das kontaminierende Myosin und durch Inkubation in 0.2 M KCl, 1 mM ATP und 2 mM $MgCl_2$ das kontaminierende Aktin aus der Rohtroponinlösung entfernt wurde (Stufe 2, s. 3.5.1.).

(C) Inkubationstest einer nach (A) gereinigten Probe unter den Bedingungen zur Aktin-Polymerisation: (a) ohne Inkubation, (b) 0.2 M KCl, 2 mM $MgCl_2$, (c) 0.2 M KCl, 1 mM ATP, (d) 0.2 m KCl, 1 mM ATP, 2 mM $MgCl_2$.

(D) Phosphatgehalt von drei Proben, die nach Tsukui/Ebashi ohne Phosphataseinhibierung präpariert wurden, und in denen durch einen DEAE-Cellulose-Chromatographie das kontaminierende Aktin abgetrennt wurde (Stufe 3, s. 3.5.1.).

(E) Phosphatgehalt einer Probe, die mit 25 mM KF in den Extraktionslösungen präpariert wurde; es wurde der Phosphatgehalt in den Fraktionen des Troponingipfels der DEAE-Cellulose-Chromatographie bestimmt.

(F) Phosphatgehalt verschiedener Proben, die nach 2.1.1. mit Phosphataseinhibierung und -Abtrennung präpariert wurden.

wurde, enthielt nach der Elution von der DEAE-Cellulose-Säule 0.5 - 1.7 Mol P/77500 g Protein (Tab. 5 (E)). Die Elution war durch einen 0.1 - 0.5 M KCl Gradienten erfolgt. Die Werte für den proteingebundenen Phosphatgehalt lagen umso höher, je später das Troponin von der DEAE-Cellulose eluierte. Der durchschnittliche Phosphatgehalt in den vereinigten und konzentrierten Fraktionen betrug 1.1 Mol P/77500 g Protein. Bei Aufbewahrung bei 4 ^{o}C nahm der Phosphatgehalt über einen Zeitraum von 3 Wochen kontinuierlich ab. ^{31}P-NMR-Messungen, die mit Troponin dieser Reinheitsstufe durchgeführt wurden, zeigten bei Zugabe von Mg^{2+}-Ionen eine deutliche Verringerung der zu beobachtenden Phospho-Serinsignale, während gleichzeitig ein Signal für freies Phosphat auftrat. Die Abnahme des proteingebundenen Phosphates beruhte auf der alkalischen Phosphatase-Verunreinigung.
Die letztendliche Modifikation des Präparationsverfahrens (Stufe 4) führte zur Abtrennung dieser Phosphatase (s. Reinigungsgang, Abb. 3) durch zusätzliche Gelfiltration über Sephacryl S 300.
Troponin, unter diesen Bedingungen präpariert, enthielt 1.8 bis 2.6 Mol P/77500 g Protein (Tab. 5 (F)); im Durchschnitt wurden 0.7 Mol P in der TnT- und 0.95 Mol P in der TnI-Untereinheit bestimmt. Auch bei längerer Inkubation unter Phosphatase-aktivierenden Bedingungen erwies sich das derart präparierte Herzmuskel-Troponin als außerordentlich stabil: nach 5-stündiger Inkubation bei 30 ^{o}C konnte kein Verlust an proteingebundenem Phosphat gemessen werden. Nach ^{31}P-NMR-Messungen, (Kap. 3.9.), die mindestens 36 Std. bei 20 ^{o}C dauerten, betrug der Verlust an proteingebundenem Phosphat maximal 0.1 - 0.3 Mol P/77500 g Protein.
Bei dem Vergleich zwischen dem proteingebundenem Phosphatgehalt des Troponin-Gesamtkomplexes und der Summe der Phosphatwerte der beiden Untereinheiten wird deutlich, daß zum Teil erhebliche Differenzen zwischen diesen beiden Werten bestehen. In Tab. 6 sind für einige Troponinproben diese Werte aufgelistet. Die größten Differenzen ergeben sich für Proben, bei denen ein hoher Phosphatgehalt für den Troponin-Gesamt-

Tabelle 6: Differenz zwischen dem proteingebundenem Phosphatgehalt aus der Bestimmung des Gesamttroponinkomplexes und der Summe der Phosphatgehaltwerte aus der Bestimmung der einzelnen Untereinheiten[a)]

Proben-Bezeichnung	Gesamtphosphatgehalt (Mol P/ 77500 D)	TnT (MoL P/ 35000 D)	TnI (MOL P/ 24000 D)	Δ =Gesamtphos. - Σ TnT, TnI	%Anteil am Gesamtphosphatgehalt TnT	TnI	Δ
R 49_A	2.59(0.18)	0.81	0.91	0.87	31.3	35.1	33.6
R 49_B[b)]	0.80(0.05)	0.8[c)]	--	--	100[c)]		
R 49 (v.NMR)[d)]	2.35(0.10)	0.81	0.91	0.63	34.5	38.7	26.8
R 48_A (v.NMR)[e)]	1.88(0.05)	0.54	0.86	0.45	28.7	45.7	23.9
(n.NMR)[e)]	1.65(0.05)	0.54	0.57	0.54	32.7	34.5	32.7
R 48_B (v.NMR)[f)]	1.23(0.03)	--	0.78	0.45		63.4	36.6
(n.NMR)[f)]	1.03(0.08)	--	0.53	0.50		51.5	48.5
R 45.1[j)] (v.NMR)[g)]	2.86(0.13)						
(n.NMR)[g)]	2.68(0.08)	0.62	0.80	1.26	23.1	29.9	47.0
R 45.2[j)] (v.NMR)[h)]	2.82(0.06)	0.53	1.18	0.99	19.6	43.7	36.6
R 44 (v.NMR)[i)]	2.18(0.06)	0.59	0.96	0.64	27.0	44.0	29.4

a) bestimmt nach 2.1.6.;

b) nach Inkubation mit der endogenen alkalischen Phosphatase (2.1.7.3.(a));

c) bestimmt nach 3.5.3.; d) NMR-Probe, s. 3.9.4.;

e) NMR-Probe, s. 3.9.2.; Phosphatgehalt vor und nach der NMR-Messung

f) NMR-Probe, s. 3.9.3., dito; g) NMR-Probe, Spektren nicht gezeigt;

h) NMR-Probe, s. 3.9.1.(B); i) NMR-Probe, s. 3.9.5.

j) Die NMR-Proben R 45.1 und R 45.2 zeigten nach der Inkubation mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (2.1.8.1.(b)) den in der Tabelle angegebenen Phosphatgehalt, ausgehend von einem Phosphatgehalt von 1.76 Mol P für die R 45.1 Probe und 1.09 Mol P für die R 45.2 Probe vor der Inkubation.

komplex bestimmt wurden. Daß es sich bei diesen Differenzwerten nicht um eine niedermolekulare Phosphatverunreinigung des Troponins handelt, sondern wahrscheinlich den Phosphatgehalt einer bestimmten Phosphorylierungsseite der TnI-Untereinheit wiedergibt, wird in den Kap. 3.5.3. und 3.9. näher begründet und in Kap. 4.2. weiter diskutiert werden. Bei der Berechnung des prozentualen Anteils der einzelnen Phosphorylierungsseiten an dem Gesamtphosphatgehalt des Troponins (s. Tab. 6) wurde dieser Differenzwert als eigenständige Phosphorylierungsseite angenommen.

3.5.2. Beeinflussung des proteingebundenen Phosphatgehaltes

Herzmuskel-Phosphotroponin wurde daraufhin getestet, inwieweit es als Substrat für alk. Phosphatase aus Kälberdarm, saure Phosphatase aus Kartoffeln, die endogenen Phosphatase-Aktivitäten, für die cAMP-abhängige Proteinkinase und für die Ca^{2+}-abhängige Phosphorylase Kinase dienen konnte.

3.5.2.1. Inkubation mit Phosphatasen

Die beiden getrennt aufgearbeiteten Phosphatase-Aktivitäten der Herzmuskel-Troponin-Präparation (Kap. 2.1.4.) wurden unter sauren wie alkalischen Bedingungen getestet. Die beiden endogenen Phosphatase-Aktivitäten zeigten keine bzw. nur eine geringe Aktivität unter den jeweils anderen pH-Bedingungen.

Im Falle der alkalischen Phosphatase wurde sie sowohl in Gegenwart von Mn^{2+}/Mg^{2+} wie auch von Zn^{2+}/Mg^{2+} getestet, um eine mit der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm konkurrierende Aktivität festzustellen. In Gegenwart von Zn^{2+}/Mg^{2+} sank die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase auf etwa 20 % des Wertes, der mit Mn^{2+}/Mg^{2+} erreicht wurde.
Bei Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm konnte man deshalb auch bei Troponin-Chargen, die noch endogene Phosphatase-Aktivität besaßen, davon ausgehen, daß der

überwiegende Anteil der zu beobachtenden Dephosphorylierung auf die Wirkung dieser exogen zugesetzten Phosphatase zurückzuführen war.

3.5.2.1.1. Inkubation mit den endogenen Phosphatasen

Es war nicht geklärt, ob Herzmuskel-Phosphotroponin für eine der beiden Phosphatasen, die während der Troponin-Präparation angereichert worden waren, oder für beide ein Substrat darstellte. Gegebenenfalls war weiterhin zu klären, welche Phosphatgruppe durch diese Phosphatasen angegriffen würde.

Herzmuskel-Phosphotroponin wurde deshalb unter Mg^{2+}- und Ca^{2+}-gesättigten Bedingungen sowohl mit Aliquoten der sauren wie der Mn^{2+}-aktivierbaren Phosphatasen versetzt und bei 30 °C für 3 Std. inkubiert. Durch Vergleich der Chargen zu Beginn und nach dem Ende der Inkubation mittels SDS-Gelelektrophorese konnte sichergestellt werden, daß keine proteolytische Degradation während der Inkubation erfolgt war. Die Ergebnisse einer solchen Inkubation sind in Tabelle 7 dargestellt.
Das Ergebnis zeigt, daß die alkalische Phosphatase-Aktivität bevorzugt Phosphat aus der TnI-Untereinheit ausbaut, während die saure Phosphatase hauptsächlich Phosphorsäure-Esterbindungen in der TnT-Untereinheit spaltet. Inkubation ohne Phosphatase-Zusatz bewirkte keinen Phosphatverlust, d.h. weitere, durch p-Nitrophenylphosphat nicht erfassbare Phosphatase-Aktivität war nicht vorhanden.
Die Spezifität der alkalischen Phosphatase zeigte sich auch nach Inkubation einer weiteren Troponinprobe (2.59 Mol P/ 77500 g Protein; s. Tab. 6, R 49_B). Die Inkubation führte zu einer Reduzierung des proteingebundenen Phosphatgehaltes auf 0.8 Mol P. Nur in der TnT-Untereinheit, die vor der Inkubation 0.8 Mol P/35000 g Protein besessen hatte, konnte noch proteingebundenes Phosphat nachgewiesen werden (s.a. Kap. 3.5.3.).

Die beiden endogenen Phosphatase-Aktivitäten besaßen demnach unterschiedliche Substratspezifität bezüglich der verschiedenen Phosphatgruppen in den Troponin-Untereinheiten.

Tabelle 7: Inkubation einer Herzmuskel-Troponinprobe mit den nach 2.1.4. angereicherten, endogenen Phosphatase-Aktivitäten[a)b)]

		Tn(77500 D)	TnT(35000 D)	TnI(24000 D)
alkalische Phosphatase-Aktivität	10 mM $MgCl_2$	0.75	0.50	0.10
	2 mM $CaCl_2$	0.69	0.42	0.01
saure Phosphatase-Aktivität	10 mM $MgCl_2$	1.17	0.15	0.61
	2 mM $CaCl_2$	1.52	0.24	0.59
ohne Phosphatasen	10 mM $MgCl_2$	1.79		
	2 mM $CaCl_2$	1.76		
ohne Inkubation[c)]		1.85	0.60	0.80

a) Die Inkubation erfolgte in 0.5 M KCl, 20 mM TRIS, pH 7.0, 1 mM EGTA, 2 mM DTE plus 10 mM $MgCl_2$ oder 2 mM $CaCl_2$.

b) Die Phosphatgehaltangaben sind Mol P/Mol Protein; der Phosphatgehalt wurde nach 2.1.6. bestimmt.

c) Phosphatgehalt der Ausgangsprobe.

3.5.2.1.2. Inkubation mit exogenen Phosphatasen

Skelettmuskel-Troponin kann sowohl von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm wie auch von saurer Phosphatase aus Kartoffeln dephosphoryliert werden; die alkalische Phosphatase setzte es mit höherer Geschwindigkeit um (Sperling, Diss. 1977).
Die Inkubation des Herzmuskel-Phosphotroponins mit diesen Phosphatasen erfolgte um zu testen, ob die Phosphorsäureester des Herz-Troponins ebenfalls durch diese Phosphatasen hydrolysiert würden, was Rückschlüsse auf die Vergleichbarkeit bestimmter Phosphatgruppen im Skelett- wie im Herzmuskel-Troponin erlaubt hätte. Darüberhinaus bestand dann die Möglichkeit, Zustände definierten Phosphatgehaltes im Herzmuskeltroponin herzustellen. Ausgehend von solchen Troponinchargen sollte die Auswirkung der unterschiedlichen Phosphatgruppen auf die Eigenschaften des Troponin-Komplexes bestimmbar sein. Im Gegensatz zu den Präparationen der endogenen Phosphatasen handelte es sich bei diesen Phosphatase-Chargen um homogene Präparate, die es erlaubten, von definierten Ausgangszuständen reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Die Inkubation mit diesen Phosphatasen erfolgte unter den angegebenen Standardbedingungen (Kap. 2.1.7.1. und 2.1.7.2.).
In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Es zeigt sich, daß Herzmuskel-Phosphotroponin ebenso wie das Skelettmuskel-Troponin Substrat für beide Phosphatasen sein kann. Die Inkubation führt allerdings nicht wie im Fall des Skelettmuskel-Troponins zu einem vollständig dephosphorylierten Troponin-Komplex, sondern es bleibt je nach Ausgangsphosphatgehalt ein beachtlicher Restanteil an proteingebundenem Phosphat zurück.

Nach Auftrennung in die einzelnen Untereinheiten konnte dieser Restanteil in der TnI-Untereinheit lokalisiert werden. Der Phosphatgehalt der TnI-Untereinheit war durch beide Phosphatasen unbeeinflußt geblieben.
Die TnT-Untereinheit wurde dagegen nach der Inkubation mit diesen Phosphatasen vollständig bzw. fast vollständig phosphatfrei; während nach der Inkubation mit der alk. Phosphatase in der TnT-Untereinheit kein Phosphat mehr nachgewiesen werden

Tabelle 8: Inkubation des Herzmuskeltroponins mit exogenen Phosphatasen nach 2.1.7.1. und 2.1.7.2.: alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (a), saure Phosphatase aus Kartoffel (b).

Troponin-charge	Ausgangsphos-phatgehalt	Verteilung TnT	TnI	nach der Inkubation	Verteilung TnT	TnI
	MolP/77500 D	MolP/ 35000 D	MolP/ 24000 D		MolP/ 35000 D	MolP/ 24000 D
R 44	2.21	0.72	1.19	(a) 1.21	-	1.15
				(b) 1.21	0.09	1.05
R 48	1.88	0.54	0.86	(a) 1.23	-	0.78
R 36	0.28	0.1	-	(a) -	-	-

Der Phosphatgehalt wurde nach 2.1.6. bestimmt

Tabelle 9: Phosphatinkorporierung durch Inkubation mit cAMP-abhängiger Proteinkinase (maximaler Einbau) (Phosphatgehalt und -einbau: Mol P/77500 D)

Troponin-charge	Ausgangsphos-phatgehalt	TnI-Unter-einheit	maximaler Einbau	Testbedin-gungen
$R\ 44_A$ [a]	2.18	0.96	0.18	analytisch
$R\ 44_B$ [a]	1.21	1.15	0.25	analytisch
$R\ 44_C$ [a]	1.21	1.05	0.30	analytisch
R 45	1.76	0.62	0.30	analytisch
R 45, nach alk. Phos.	1.09	0.41	0.50	analytisch
R 45.1	1.76	0.62	1.10	präparativ
R 45.2	1.09	0.41	1.70	präparativ
$R\ 48_A$ [b]	1.88	0.86	0.37	analytisch
$R\ 48_B$ [b]	1.23	0.78	0.37	analytisch

Die Phosphorylierung der Troponinproben erfolgte nach der unter 2.1.8.1. angegebenen Methoden. Der maximale Einbau wurde für die analytischen Einsätze nach 2.2.10. bestimmt. Bei den präparativen Ansätzen errechnete er sich aus den Phosphatgehaltwerten, die nach 2.1.6. für den Gesamtkomplex vor und nach der Proteinkinase-Inkubation bestimmt wurden.

[a] $R\ 44_A$: Ausgangsprobe, $R\ 44_B$: nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm, $R\ 44_C$: nach Inkubation mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln; s. Tab. 8;

[b] $R\ 48_A$: Ausgangsprobe, $R\ 48_B$: nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm; s. Tab. 8.

konnte, verblieben bei der Inkubation mit der sauren Phosphatase nach einer Inkubationszeit von 1 Std. ein Restgehalt von 0.09 Mol P/Mol TNT.
Isoelektrische Fokussierung der Phosphatase-behandelten Proben bestätigten den Verlust an proteingebundenem Phosphat aus der TnT-Untereinheit (s. Kap. 3.5.3.).

3.5.2.2. Phosphorylierung mit cAMP-abh. Proteinkinase

Die Phosphorylierung des Herzmuskel-Troponins mit der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (2.1.5.) zeigt die erwartete Spezifität, mit hohen Einbauraten wurde Phosphat in die TnI-Untereinheit eingebaut, wahrscheinlich in die Ser(20)-Seite (s. Abb. 1; Perry, 1979).
Der Phosphateinbau wurde normalerweise über den Anstieg der ^{32}P-Markierung des Troponins bei Inkubation mit γ-^{32}P-ATP verfolgt (s. Kap. 2.2.10.). In einigen Fällen wurde der Gesamtgehalt an proteingebundenem Phosphat allerdings auch naßchemisch nach dem in Kap. 2.1.6. beschriebenem Verfahren bestimmt; die Verteilung des Phosphatgehaltes auf die Untereinheiten erfolgte nach der Auftrennung des Troponins in seine Untereinheiten (s. Kap. 2.1.2.).
Der Phosphateinbau in das Herzmuskel-Troponin in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 7 und 8 wiedergegeben. Tabelle 9 faßt die Werte des maximalen Phosphateinbaues für Troponinchargen zusammen, die nach 2.1.1. präpariert worden waren.
Der max. Phosphateinbau in die TnI-Untereinheit nach Inkubation mit cAMP-abh. Proteinkinase variierte zwischen 0.18 und 1.70 Mol P/Tn. Die niedrigsten Einbauwerte an ^{32}P-Phosphat wurden für solche Troponinchargen bestimmt, die einen hohen endogenen, proteingebundenen Phosphatgehalt besaßen. Unter diesen Voraussetzungen lagen die dann erzielten max. Einbauwerte zwischen 0.17 und 0.50 Mol P/77500 g Protein; je höher der Ausgangswert an proteingebundenem Phosphat in der TnI-Untereinheit lag, umso niedriger war der Wert für das noch zusätzlich einzubauende Phosphat. Der Phosphatgehalt der TnT-Untereinheit be-

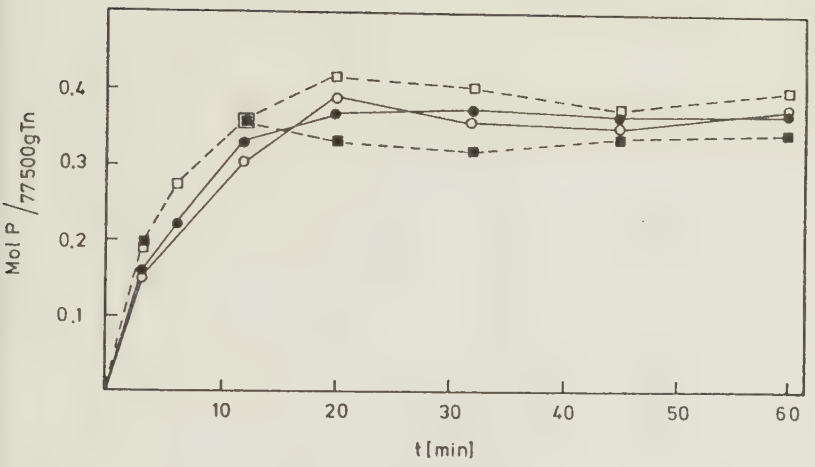


Abb. 7: Phosphorylierung des Herzmuskel-Troponins durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (katalytische Untereinheit)

Herzmuskeltroponin-Proben mit unterschiedlichem Phosphatgehalt wurden mit der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase unter $\pm$ a^{2+}-Bedingungen inkubiert.

(A) Tn (2.71 nMol Tn/200 µL); Phosphatgehalt: 1.88 Mol P/ 77500 g Tn; 0.54 Mol P in der TnT-, 1.34 Mol P in der TnI-Untereinheit); $+Ca^{2+}$:●——●, $-Ca^{2+}$: o——o;

(B) Tn (2.63 nMol Tn/200 µL); Phosphatgehalt: 1.23 Mol P/ 77500 g Tn (nach 2.1.7.1. dephosphoryliert); -- Mol P/ TnT; 1.23 Mol P/TnI; $+Ca^{2+}$:■-----■, $-Ca^{2+}$:□-----□

Das Herzmuskel-Troponin wurde in 0.1 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.2, 1 mM DTE, 5 mM $MgCl_2$, 100 µM $CaCl_2$ oder 1 mM EGTA, 0.5 mM γ^{32}P-ATP (1 Ci/Mol) bei 30 °C für 1 Std. inkubiert (2.1.8.1.(a)). Der Nachweis des inkorporierten Phosphates erfolgte nach 2.2.10..

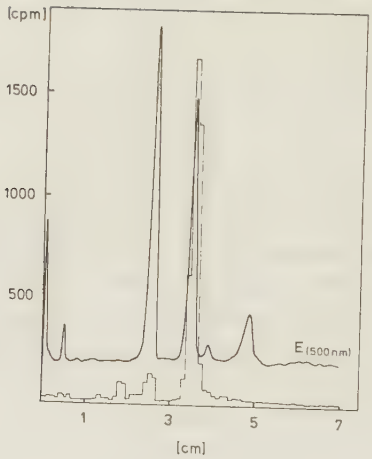


Abb. 8: Lokalisation des Phosphateinbaues in den Untereinheiten des Troponins nach Inkubation mit cAMP-abhängiger Proteinkinase

25 µL Aliquote des Inkubationsansatzes der Abb. 7 wurden mit 1 mL 10 % TCA-Lösung gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Protein entsprechend dem Kap. 2.2.3.1.(a) gelelektrophoretisch aufgetrennt und der ^{32}P-Einbau nach 2.2.11. bestimmt.

einflußt offensichtlich den max. Einbauwert für die TnI-Untereinheit nicht. Der Vergleich zwischen Proben, die sich nur darin unterschieden, daß in einem Teil der Probe durch Inkubation mit Phosphatasen (n. 2.1.7.1. und 2.1.7.2.) das proteingebundene Phosphat aus der TnT-Untereinheit entfernt worden war (Tab. 9: R $44_{A,B,C}$; R $48_{A,B}$), ergibt für die Inkubation mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase vergleichbare Werte für die Phosphorylierung der TnI-Untereinheit. Troponinchargen, die nicht durch die Kombination des DEAE-Cellulose-Schrittes und der anschließenden Gelfiltration gereinigt worden waren, und bei denen Phosphatase-Aktivität anzunehmen ist, wie z.B. bei den ersten Präparationen, zeigten höhere Phosphatübertragungswerte. Sie lagen zwischen 0.72 und 1.16 Mol P_i/77500 g Protein. Sie waren unabhängig von den Ausgangswerten an proteingebundenem, endogenen Phosphat.
Im Gegensatz zu der Phosphorylierung bei Inkubation mit cAMP-abhängiger Proteinkinase und γ-^{32}P-ATP, bei der die Phosphatübertragung nach TCA-Präzipitation und TCA-Waschung des Proteinniederschlages mit einem Szintillationszähler erfolgte, konnten nach Inkubation mit nicht radioaktiv markiertem ATP und Auslassung der TCA-Schritte Einbauwerte von 1.1 bzw. 1.70 Mol P /77500 g Protein erzielt werden. Bei diesen (halbpräparativen) Versuchen wurde das eingesetzte Troponin nach 2.1.8.1.(b) gereinigt. Auch bei diesen Inkubationsversuchen erfolgte eine Phosphatübertragung nur auf die TnI-Untereinheit. Eine Diskussion dieses unterschiedlichen Verhaltens erfolgt in Kap. 4.2..

3.5.2.3. Phosphorylierung des Herzmuskeltroponins mit der Ca^{2+}-abhängigen Phosphorylase Kinase

Das Herzmuskel-Troponin war in der Ca^{2+}-Abhängigkeit seiner Phosphorylierung mit der Phosphorylase-Kinase qualitativ wie quantitativ verschieden von der des Skelettmuskel-Troponins. Bei 10^{-8} M Ca^{2+} erfolgte keine Phosphorylierung einer der Untereinheiten, im Gegensatz zum Skelettmuskel-Troponin, in das

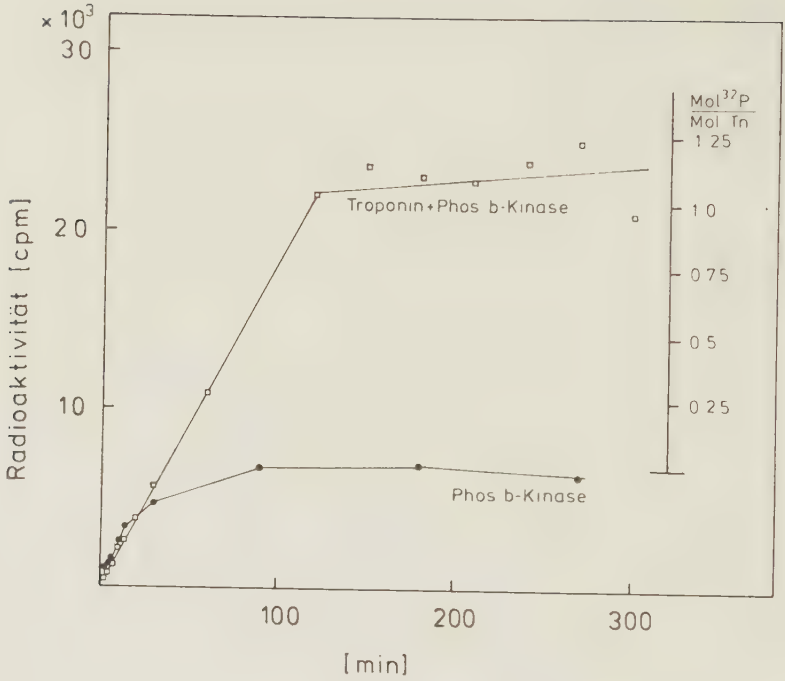


Abb. 9: Phosphorylierung des Herzmuskeltroponins mit Phosphorylase-Kinase

Troponin (1 mg/mL) (0.1 Mol P/77500 g Tn) wurden in 50 mM Tris, pH 7.2, 1.0 mM DTE, 4 mM $MgAc_2$, 1 µM $CaCl_2$, 50 µg Phosphorylase-Kinase 2 mM ATP-γ-^{32}P(10 µCi/ mL) bei 30 °C inkubiert. Zu den in der Abbildung angegebenen Zeiten wurden 40 µL Aliquote dem Inkubationsgefäß entnommen; die proteingebundene Radioaktivität wurde nach 2.2.10. bestimmt. Zur Berücksichtigung der Eigenphosphorylierung der Phosphorylase-Kinase wurde ein 500 µL-Ansatz ohne Troponin unter identischen Bedingungen inkubiert. Die Lokalisation des Phosphateinbaues erfolgte nach 2.2.11..

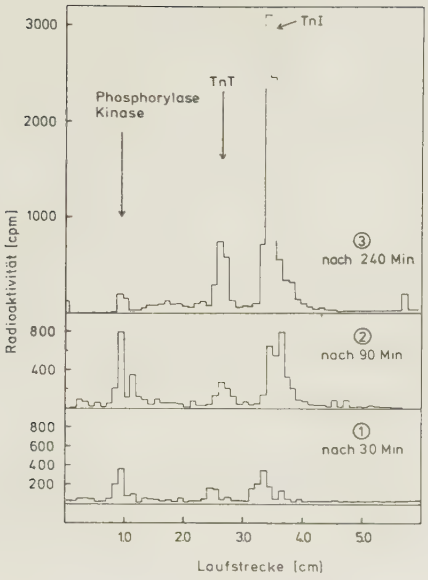


Abb. 10: Lokalisation des ^{32}P-Phosphates in den Untereinheiten des Troponins nach der Inkubation mit Phosphorylase-Kinase

Zu dem im Diagramm angegebenen Zeiten wurden 25 µL Aliquote aus dem Inkubationsansatz der Abb. 9 entnommen, mit 10 % TCA-Lösung gefällt und nach einer Zentrifugation gemäß 2.2.3.1.(a) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Lokalisation und Zuordnung des ^{32}P-Einbaues erfolgte nach 2.2.11..

unter diesen Bedingungen Phosphat in die TnI-Untereinheit eingebaut wurde (Sperling, 1977).
Bei 10^{-5} M Ca^{2+} erfolgte eine Phosphorylierung sowohl in der TnT- als auch in der TnI-Untereinheit des Herzmuskel-Troponins. Gemessen mit unterschiedlichen Troponinchargen betrug der Einbau im Durchschnitt 0.4 Mol Phosphat/77500 g Protein nach 1 Stunde; er erhöhte sich bis auf 1.4 Mol P /77500 g Troponin nach 3 Stunden Inkubation. Die Phosphorylierung der beiden Untereinheiten TnT und TnI erfolgte mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Nach 3stündiger Inkubation betrug der Phosphateinbau 20 % in die TnT- und 80 % in die TnI-Untereinheit (s. Abb. 9 und 10).
Inkubation von Troponinchargen, die unter Phosphatase-inaktivierenden Bedingungen präpariert worden waren, und die durch DEAE-Cellulose-Chromatographie und Gelfiltration von endogener Phosphatase-Aktivität befreit worden waren, konnten mit Phosphorylase-Kinase nicht phosphoryliert werden.

3.5.3. Analyse der Phosphatverteilung im Troponinkomplex mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (NEPHGE-System, O'Farrell et al., 1977)

Durch die Phosphorylierung eines Proteins, d.h. durch die Übertragung einer Phosphatgruppe auf das Protein, wird eine Veränderung der Gesamtladung des Proteins bewirkt: 2 negative Ladungen werden eingefügt und die Gesamtladung des Proteins wird zum sauren Bereich verschoben. Phosphorylierte Untereinheiten sollten entsprechend ihres Phosphatgehaltes einen anderen isoelektrischen Punkt besitzen und bei einem saureren pH-Wert präzipitieren.
Besonders für die Auftrennung von basischen Proteinen wurde das NEPHGE-System (nonequilibrium-pH-gradientelectrophorisis) entwickelt, bei dem der pH-Gradient erst während des Elektrophorese-Laufes entsteht. Da es von besonderem Interesse war, die mehrfach phosphorylierte Troponin-Untereinheit TnI, ein basisches Protein, gut in ihre unterschiedlichen Phosphokomplexe aufzutrennen, wurde die NEPHGE-Methode für

die isoelektrische Fokussierung gewählt. Sie stellt neben der naßchemischen Phosphatbestimmungsmethode (nach Bartlett, s. Kap. 2.1.6.) und der ^{31}P-Spektroskopie eine weitere, unabhängige Methode zur Bestimmung und Analyse des proteingebundenen Phosphatgehaltes dar.
Für die Analyse wurden sowohl Gesamttroponin-Chargen wie auch isolierte Untereinheiten eingesetzt. Neben der Verteilung des proteingebundenen Phosphates auf die Untereinheiten sollte in dem Vergleich zwischen einem Gesamttroponin-Komplex und den aus diesem Komplex isolierten Untereinheiten festgestellt werden, ob durch die Auftrennung in die Untereinheiten proteingebundenes Phosphat verlorengeht.
In der Abbildung 11 sind 10 IEF-Gele wiedergegeben, auf denen Herztroponin-Proben (Tn-Komplex oder Untereinheiten) nach ihrer Ladung und ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt worden sind (2.2.3.3.). Auf den ersten 5 Gelen wurden Aliquote von 5 verschiedenen Holotroponinproben aufgetragen; auf die restlichen fünf Gele wurden Untereinheitsproben gegeben, TnI-Untereinheit (Gele 6-8), TnT-U. (Gel 9) und TnC-U. (Gel 10).

An Hand der Fokussierungsorte der Banden, die sich für die isolierten Untereinheiten ergaben, konnten die Untereinheiten in den Gesamttroponinproben identifiziert werden. Betrachtet man die Gele von oben nach unten (in Richtung der Wanderung der Proteinbanden), so ist zu erkennen, daß an der Auftragsstelle des Gels die TnC-Untereinheit präzipitiert ist (vergleiche Gele 1-5 und Gel 10). Diese Stelle entspricht der sauren pH-Seite (pH-Wert <3.5) des pH-Gradienten. Das nächste Bandenmuster aus bis zu vier Banden unterschiedlicher Intensität wird von der TnT-Untereinheit hervorgerufen. Als letzte folgte im unteren Bereich des Geles die TnI-Untereinheit, die drei Hauptbanden zeigen kann.
Da die TnC-Untereinheit kein Phosphat enthält, kann das gesamte proteingebundene Phosphat nur in den Untereinheiten TnT und TnI lokalisiert sein. Zumindest für die Gesamttroponinchargen ist eine nennenswerte Carbamylierung auszuschließen, da nur eine geringe Expositionsdauer gegenüber frisch angesetzter Hernstofflösung bestand. Die unterschiedlichen Banden können deshalb auf steigenden Phosphatgehalt zurückgeführt werden.

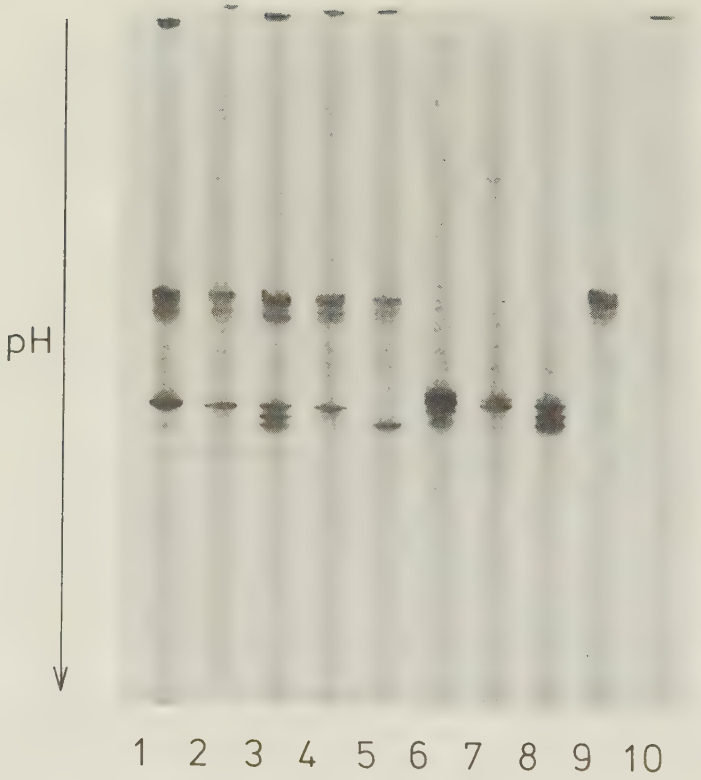


Abb. 11: Isoelektrische Fokussierung von Gesamttroponin-Proben (Gele 1-5) und isolierten Untereinheiten dieser Proben (Gele 6-10)

Die isoelektrische Fokussierung (NEPHGE-System) wurde, wie in 2.2.3.3. beschrieben, durchgeführt und die Gele entsprechend gefärbt. 500 µL der jeweiligen Proteinlösung wurden für 24 Std. bei 4 °C unter mehrfachem Wechsel der Lösung gegen 6 M Harnstoff, 4 % Nonidet P-40, 2 % ME dialysiert. Danach wurden durch Zugabe von Harnstoff und Servalyt (pH 3.5-10) die gewünschten Probenpuffer-Konzentrationen eingestellt.

Es wurden folgende Holotroponin- und Untereinheitschargen aufgetragen:

Holo-Troponin	Phosphatgehalt	Untereinheiten	Phosphatgehalt
1. R45.1.	2.68 Mol P	6. TnI,R45.1.	2.06 Mol P
2. R45.2.	2.70	7. TnI,R45.2.	2.20
3. $R48_B$	1.03	8. TnI,$R48_B$	1.03
4. R49	2.59	9. TnT,R49	0.81
5. $R49_{Dephospho-TnI}$	0.80	10. TnC,R49	-

Für die TnI-Untereinheit ergibt sich daraus, daß sie maximal 2 Phosphatgruppen enthalten kann; für die TnT-Untereinheit wäre an Hand des Bandenmusters eine maximale Phosphorylierung an drei Seiten denkbar.
Der Vergleich zwischen dem Bandenmuster einer TnT- oder TnI-Untereinheit in dem Gel des Holotroponinkomplexes mit dem Bandenmuster der isolierten Untereinheit zeigt, daß durch die Harnstoffauftrennung über die DEAE-Sephadex-Säule (2.1.2.) der Phosphatgehalt in der jeweiligen Untereinheit nicht verändert worden ist. Es wird in beiden Fällen ein identisches Bandenmuster gefunden. Differenzen im Phosphatgehalt zwischen Gesamttroponinproben und den isolierten Untereinheiten dieses Gesamtkomplexes sind deshalb wahrscheinlich auf das naßchemische Nachweisverfahren (2.1.6.) zurückzuführen (s. Kap. 4.2.).
Die Holotroponinproben (Gele 1-5) unterscheiden sich hinsichtlich ihres Phosphatgehaltes. Neben Probe R 49 (Gel Nr. 4), die einen Phosphatgehalt (2.57 Mol P/77500 g Troponin) zeigt, wie er für die Probe nach der Präparation festgestellt worden war, sind andere Proben wiedergegeben, die in ihrem Phosphatgehalt durch Kinase- oder Phosphataseinkubation verändert worden sind. Die Veränderung kann sich sowohl auf die TnT- als auch auf die TnI-Untereinheit beziehen.
Gele 1 und 2 (Abbildung 11) zeigen Troponinproben, die durch präparative Phosphorylierung mit cAMP-abhängiger Proteinkinase auf einen Gesamtphosphatgehalt von 2.86 bzw. 2.60 Mol P /77500 g Troponin gebracht wurden. Die cAMP-abhängige Phosphorylierung ist spezifisch für die TnI-Untereinheit; beide Troponinproben zeigen im Bereich der TnI-Untereinheit nur eine intensive Bande, die charakteristisch für eine zweifach phosphorylierte TnI-Untereinheit ist. Dies ergibt sich aus dem Vergleich mit Proben, bei denen die TnI-Untereinheit nur teilweise phosphoryliert ist (s. Gel 3). Ebenfalls an zwei Seiten der TnI-Untereinheit ist das Troponin der Probe R 49 (Gel Nr. 4) phosphoryliert; nach Inkubation des Troponins mit der Mn^{2+}-abhängigen Phosphatase-Aktivität (2.1.4.(a)), zeigt sich

wiederum nur eine Bande für die TnI-Untereinheit (s. Gel Nr. 5). Diese Bande erscheint aber bei einem alkalischeren pH-Wert. In Übereinstimmung mit dem um 1.8 Mol P/77500 g Troponin verringerten Gesamtphosphatgehalt (bestimmt nach 2.1.6.) und aus dem Vergleich mit dem Bandenmuster anderer TnI-Untereinheiten kann diese, am weitesten im alkalischen Bereich liegende Bande dem Dephospho-TnI zugeordnet werden. Eine dritte, zwischen diesen beiden TnI-Banden zu beobachtende Bande, entspricht der monophosphorylierten TnI-Untereinheit (s. Gel Nr. 3). Die vergleichsweise hohe Zahl der TnT-IEF-Banden ist schon erwähnt worden. Da für die isolierte TnT-Untereinheit ein maximaler Phosphatgehalt von 1.0 Mol P bestimmt wurde, ergaben sich bei der Interpretation dieses Phänomens gewisse Schwierigkeiten. Eine mögliche Lösung des Problems läßt sich aus dem Vergleich der Phospho-Form (z.B. Gele Nr. 1,2,4,5) und der durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase (s. Kap. 2.1.7.1.) erzeugten Dephospho-TnT-Form herleiten (Gel Nr. 3). Naßchemisch läßt sich nach der Inkubation mit alkalischer Phosphatase kein Phosphat mehr in der TnT-Untereinheit nachweisen. Es sind aber auch nach der Phosphatasebehandlung noch zwei intensive Banden für die TnT-Untereinheit bei der isoelektrischen Fokussierung zu beobachten (Gel Nr. 3). Der Abstand zwischen diesen beiden Banden ist zu groß, als daß er auf Ladungsunterschiede, hervorgerufen durch Restmengen an proteingebundenen Phosphat, zurückzuführen wäre. Gusev et al. (1983) wiesen kürzlich die Existenz zweier Isoformen für die TnT-Untereinheit des Herzmuskeltroponins nach. Die hier zu beobachtende Aufspaltung der TnT-Banden läßt sich in gleicher Weise interpretieren, wobei allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gusev et al. in diesem Falle beide Isoformen phosphoryliert sein können.

3.6. Stöchiometrie des Troponin-Komplexes; Färbefaktoren der Untereinheiten und Intensitätsverteilung für die Untereinheiten im Holotroponin

Die quantitative Auswertung von SDS-Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, Aufschluß über die Zusammensetzung eines Komplexes an Hand der Intensität der Proteinbanden zu erhalten und so bei bekannten Färbefaktoren für die jeweilige Untereinheit die Stöchiometrie eines heteromeren Komplexes zu bestimmen. Aliquote der Untereinheiten (präpariert und gereinigt nach dem in Kap. 2.1.2. beschriebenen Verfahren), die zwischen 0.5 und 5 µg Protein der jeweiligen Untereinheit enthielten, wurden auf SDS-Gele (nach Cohen, Kap. 2.2.3.1.) aufgetragen und wie unter 2.2.3.2. angegeben behandelt. Nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung und anschließender Entfärbung der Gele wurden die Färbeintensitäten der einzelnen Banden ermittelt. Aus einer Auftragung der Färbeintensitäten gegen die jeweils eingesetzten Proteinmengen wurden mittels einer Regressionsanalyse die Färbefaktoren für jede Untereinheit bestimmt.
In Analogie zu den in der Literatur angegebenen Werten wurden die Färbefaktoren relativ zur Färbeintensität der TnC-Untereinheit ausgedrückt.
Die Färbefaktoren lauten:

TnT	2.36
TnI	2.51
TnC	1.00

(Die Umrechnungsfaktoren von Flächeneinheiten auf molare Werte sind:

TnT (35000 D)	82.2	$\frac{\text{Flächeneinheit}}{\text{Mol}}$
TnI (24000 D)	60.2	
TnC (18500 D)	18.5.)	

In der Tabelle 10 ist die molare Zusammensetzung verschiedener Troponin-Chargen zusammengestellt worden, wie sie sich unter Benutzung der oben angegebenen Umrechnungsfaktoren berechnen läßt.

Tabelle 10: Molare Zusammensetzung verschiedener Troponinproben[a)]

	TnT	TnI	TnC
(1) R 43	1.06	0.86	1.16
(2) R 44	1.17	0.97	1.00
(3) R 45	1.08	0.96	1.02
(4) R 48_A	0.96	1.04	1.06
(5) R 48_B	1.00	1.00	0.98
(6) R 49	1.13	0.98	1.08
$\bar{x}$(1.-6.)	1.07 (.08)	0.97 (.06)	1.05 (.07)
(7) R 9	1.10	1.35	1.00
(8) R 13	1.05	1.29	1.00
(9) R 18	1.61	1.56	1.00
(10) R 19	1.45	1.55	1.00

a) Troponinproben wurden nach 2.2.3.1. auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS aufgetrennt. Die Intensität der eingefärbten Proteinbanden wurden nach 2.2.3.2. bestimmt. Mit den in 3.6. angegebenen Umrechnungsfaktoren wurde die molare Zusammensetzung der untersuchten Troponinproben berechnet.
Die Proben (1) - (6) wurden nach der in 2.1.1. angegebeen Methode präpariert. $\bar{x}$ ist der aus der Proben (1) - (6) berechnete Mittelwert für die einzelnen Untereinheiten. Die Proben (7) - (10) wurden nach dem Tsukui/Ebashi-Verfahren (1973) mit zwei anschließenden Gelfiltrationsschritten präpariert (s. 3.5.1.).

Das nach dem in dieser Arbeit entwickelten Reinigungsverfahren isolierte Troponin (R 43 - R 49) zeigt eine 1:1:1 Stöchiometrie. Die letzten vier in Tabelle 10 aufgeführten Proben wurden ohne einen DEAE-Cellulose-Schritt präpariert. In diesem Material ist ein erhöhter TnT- wie auch ein erhöhter TnI-Gehalt festzustellen.

3.7. Hydrodynamische Untersuchungen am Herzmuskel-Troponin

Verschiedene hydrodynamische und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Skelett- und Herzmuskel-Troponin deuteten darauf hin, daß es sich im Fall des Troponin-Komplexes um einen asymmetrischen, vermutlich linearen Komplex handelt (Byers et al., 1979; Ohtsuki, 1980). Für das Troponin mußte deshalb die Annahme eines globulären Molekülkomplexes revidiert werden. Um sich eine Vorstellung von den räumlichen Dimensionen des Troponins zu machen, erschien eine Untersuchung des Troponin-Komplexes mit hydrodynamischen Methoden sinnvoll. Durch Kombination der Daten, die man aus Ultrazentrifugationsläufen, Viskositätsmessungen und durch Gelfiltrationsläufe erhalten kann, läßt sich eine Abschätzung der räumlichen Parameter erreichen.
Die hydrodynamischen Parameter aus der vorliegenden Untersuchung sind in Tab. 11 zusammengefaßt.

3.7.1. Zentrifugationsläufe mit der analytischen Ultrazentrifuge

3.7.1.1. Bestimmung der Sedimentationskonstanten $S^{o}_{20,W}$

Nach 2.2.4.1. wurde die Sedimentationsgeschwindigkeit des Herzmuskel-Troponins bei 20 °C bestimmt. Aus einer Auftragung der Wanderungsstrecke der Lösungsmittel/Proteinlösungs-Grenzschicht gegen die Zeit wurde der Sedimentationskoeffizient ermittelt (Abb. 13) und nach Gleichung (2) (Kap. 2.2.4.2.) auf die Standardbedingungen umgerechnet. Die Abhängigkeit der Sedimentationskonstanten von der Proteinkonzentration wurde

Abb. 13: Sedimentationsverhalten des Herzmuskel-Troponins

Nach 2.2.4.1. wurde für Herzmuskel-Troponinproben unterschiedlicher Proteinkonzentrationen in 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, pH 7.2, 1 mM DTE, 1 mM EGTA die Wanderungsstrecke der Proteinlösung/Puffer-Grenzschicht durch Messung des Extinktionsprofils über die Zellenlänge bestimmt. Die Sedimentation erfolgte in einer 12 mm Doppelsektor-Zelle bei 20 °C. Es sind die Proteinkonzentrationen, die Umdrehungszahl, der Zeittakt und die Wellenlänge angegeben, bei denen die einzelnen Messungen erfolgten. Die Proteinbestimmung erfolgte nach 2.2.8..

(A) 1 mM EGTA:

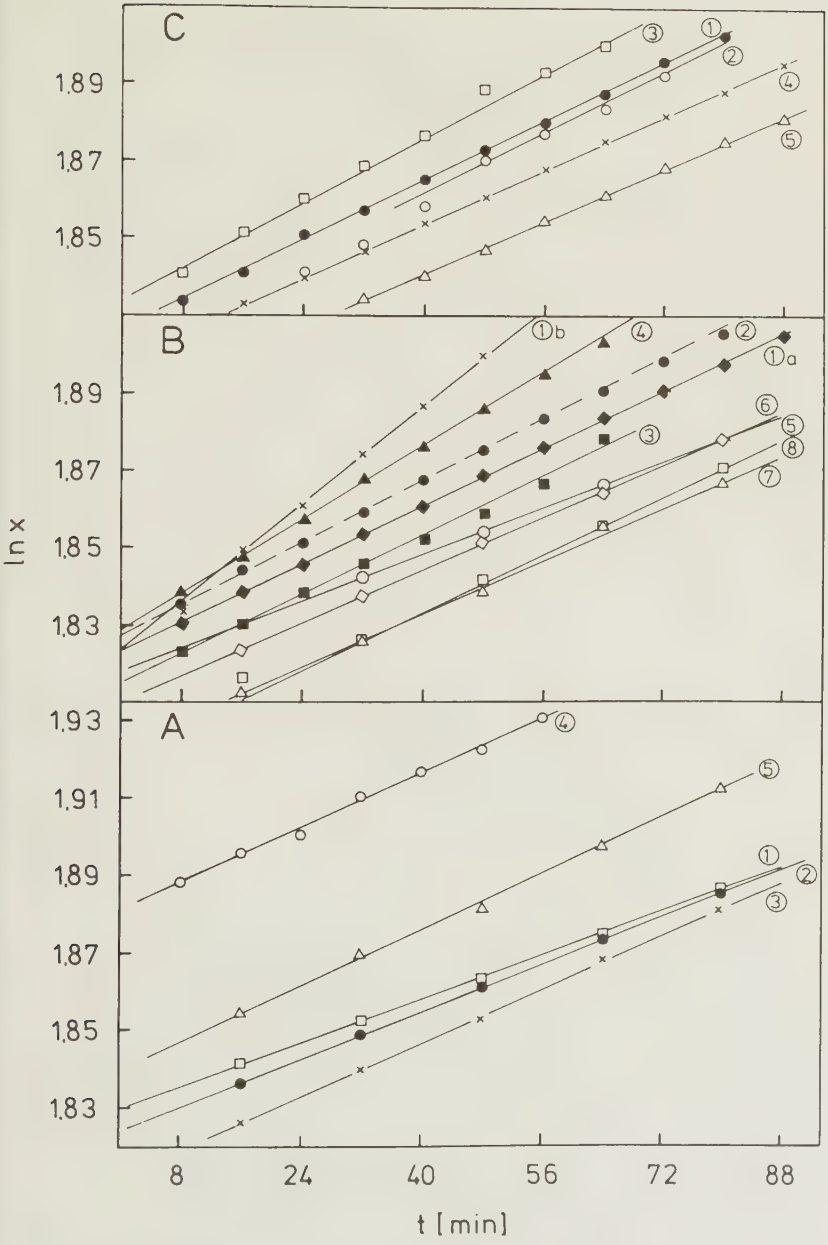
1.	0.83 mg/mL	55940 UpM	280 nm	16 Min.
2.	1.43	56017	280 nm	16 Min.
3.	4.22	56093	290 nm	16 Min.
4.	7.15	56011	295 nm	16 Min.
5.	7.17	55950	295 nm	8 Min.

(B) +10 mM Mg^{2+}:

1.	0.72 mg/mL	55928 UpM	280 nm	16 Min.
2.	1.50	63936	280 nm	8 Min.
3.	1.54	55946	290 nm	16 Min.
4.	3.11	55959	290 nm	16 Min.
5.	3.66	59943	289 nm	8 Min.
6.	3.90	59946	290 nm	8 Min.
7.	4.02	55939	290 nm	16 Min.
8.	4.65	55946	290 nm	16 Min.
9.	6.40	63945	295 nm	8 Min.

(C) +2 mM Ca^{2+}:

1.	0.70 mg/mL	63930 UpM	280 nm	8 Min.
2.	1.55	59938	285 nm	8 Min.
3.	3.08	63930	290 nm	8 Min.
4.	4.93	59938	290 nm	8 Min.
5.	7.39	63939	292 nm	8 Min.


C
B
A
1,89
1,87
1,85
1,83
1,93
1,91
ln x
8
24
40
56
72
88
t [min]
①
②
③
④
⑤
⑥
⑦
⑧
①a
①b

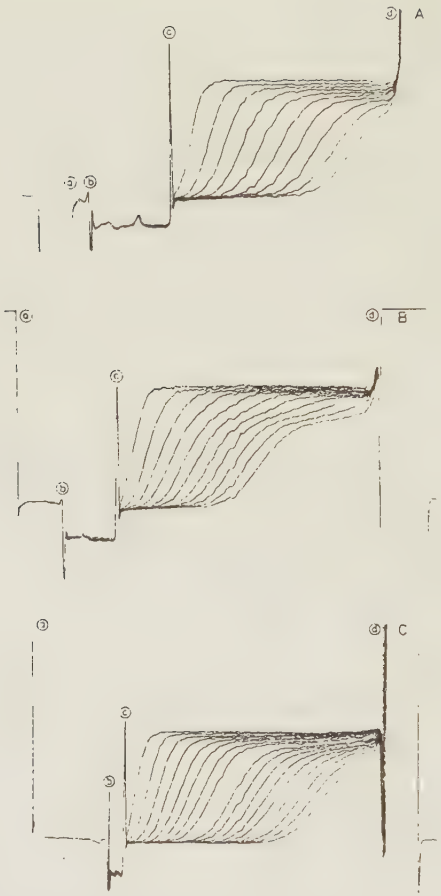


Abb. 14: Sedimentationsprofile von Herzmuskel-Troponin-Proben unter den Metall(II)ionen-Bedingungen: 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$ und 2 mM $CaCl_2$

In den Teilabbildungen (A), (B) und (C) sind die Sedimentationsprofile dreier Herzmuskel-Troponinproben wiedergegeben, die bei folgenden Protein- und Metall(II)ionen-Konzentrationen aufgenommen wurden: (A): 1 mM EGTA, 1.43 mg/mL; (B) 10 mM $MgCl_2$, 1.50 mg/mL; (C) 2 mM $CaCl_2$, 1.55 mg/mL. Die übrigen Versuchsbedingungen sind im Kap. 2.2.4.1. und in der Legende zu Abb. 13 wiedergegeben.
(a) Oberkante der Zelle, (b) Luft-Lösungsmittel-Meniskus, (c) Lösungsmittel-Lösung-Meniskus, (d) Zellenboden

durch die Bestimmung des S-Wertes für Proteinkonzentrationen zwischen 0.7 und 7.4 mg Tn/mL ermittelt.
In Abb. 14 sind die Sedimentationsprofile für 3 Herzmuskeltroponin-Proben bei den im Versuch eingesetzten Metall(II)ionen-Bedingungen gezeigt.
Während unter EGTA- bzw. Ca^{2+}-Bedingungen eine einheitliche Sedimentationsgrenzschicht zu sehen ist, zeigt diese unter den Mg^{2+}-Bedingungen einen zweiphasigen Verlauf. Besonders deutlich wird dies an den Grenzschichten zum Ende des Sedimentationslaufs. Unter Mg^{2+}-Bedingungen liegt offensichtlich ein Gemisch von (mindestens) zwei unterschiedlich schnell sedimentierenden Spezies vor. Ein vergleichbares Verhalten ist für die Troponin-Proben unter EGTA-, bzw. Ca^{2+}-Bedingungen erst bei höheren Proteinkonzentrationen festzustellen (>4 mg/mL).
Die Auftragungen der aus diesen Sedimentationsläufen berechneten $S_{20,W}$-Werte gegen die Proteinkonzentration der entsprechenden Lösung sind in Abb. 15 wiedergegeben.
Die Sedimentationskonstanten für die Mg^{2+}-enthaltenden Lösungen zeigen eine größere Streuung als die Werte für die EGTA- bzw. $CaCl_2$-Lösungen. Eine mögliche Ursache könnte darin zu sehen sein, daß unter den $MgCl_2$-Bedingungen verschiedene Aggregationszustände vorgelegen haben, die ein unterschiedliches Sedimentationsverhalten besitzen.
Der Anstieg der Sedimentationskoeffizienten mit steigender Proteinkonzentration deutet auf eine Proteinassoziation hin. Der über den gesamten vermessenen Proteinbereich zu beobachtende monotone Anstieg der Geraden ist ein Hinweis darauf, daß unter den vorliegenden Puffer- und Proteinkonzentrationen ein Endpunkt der Proteinassoziation noch nicht erreicht ist.
Aus den $S_{20,W}$-Werten von 3.60 (EGTA), 3.70 ($CaCl_2$) und 3.91 S ($MgCl_2$) wurden die Stokesschen Radien und die Reibungskoeffizienten berechnet. (s. Kap. 3.7.4.).

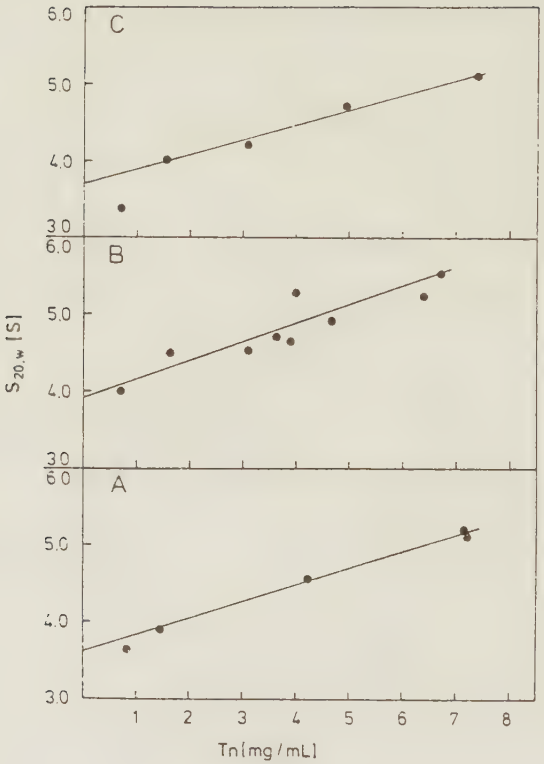


Abb. 15: Abhängigkeit der Sedimentationskonstante $S_{20,w}$ des Troponins von der Proteinkonzentration

In den Teilabbildungen (A), (B) und (C) sind die nach der Gleichungen (1) und (2) (2.2.4.2.) berechneten Sedimentationskonstanten des Troponins gegen die Proteinkonzentration der eingesetzten Lösung aufgetragen. Die Versuchsbedingungen sind in der Legende zu Abb. 13 wiedergegeben.

(A): 1 mM EGTA-Puffer; $S^o_{20,W}$ = 3.60 S
(B): 10 mM $MgCl_2$-Puffer; $S^o_{20,W}$ = 3.91 S
(C): 2 mM $CaCl_2$-Puffer; $S^o_{20,W}$ = 3.70 S

3.7.1.2. Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes des Troponins aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen

In Abb. 16 (A-C) werden für die drei Metall(II)ionen-Bedingungen (EGTA, Mg^{2+}, Ca^{2+}) die Auftragungen der ln E-Werte gegen r^2 (E = Extinktion der Proteinlösung beim Radius r) wiedergegeben. Nach Gleichung (3) (in Kap. 2.2.4.4.) errechnen sich daraus die folgenden apparenten Molekulargewichte:

1 mM EGTA: 83325 D
10 mM Mg^{2+}: 92860 D
2 mM Ca^{2+}: 86814 D

Die Anfangskonzentration für diese Ultrazentrifugationsläufe betrug 0.41 mg/mL, die Umdrehungszahl 9989 UpM. Für eine weitere Probe wurde bei einer Umdrehungszahl von 15994 UpM und einer Proteinkonzentration von 0.30 mg/mL für die Ca^{2+}-Probe ein Molekulargewicht von 88344 D berechnet. Für die EGTA- und die Mg^{2+}-Proben wurden unter diesen Bedingungen mit großem Anteil höhermolekulare Komplexe (159 000 D und 137 730 D) bestimmt.

Die Ergebnisse der Gleichgewichtsläufe bestätigen ebenfalls, daß das Troponin sich in einem Aggregationsgleichgewicht befindet. Trotz der niedrigen Proteinkonzentration wurde, in Abhängigkeit von der Umdrehungszahl, ein Übergang zu höhermolekularen Aggregaten für höhere Proteinkonzentrationen im Bereich des Zellenbodens beobachtet. Hauptsächlich die Ergebnisse der Ca^{2+}- und EGTA-Proben sprechen für ein Monomeren-Molekulargewicht von 80000 D, wie es für das Herzmuskel-Troponin bei einer 1:1:1-Stöchiometrie zu erwarten wäre.

3.7.2. Bestimmung der intrinsischen Viskosität des Herzmuskel-Troponins

Die Abhängigkeit der reduzierten Viskosität des Herzmuskel-Troponins von der Proteinkonzentration und den zweiwertigen Metallionen im Puffer ist in Abb. 17 wiedergegeben. In den einzelnen Teilabbildungen ist der Term $t - t_o/t_o c$ gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Durch Extrapolation auf

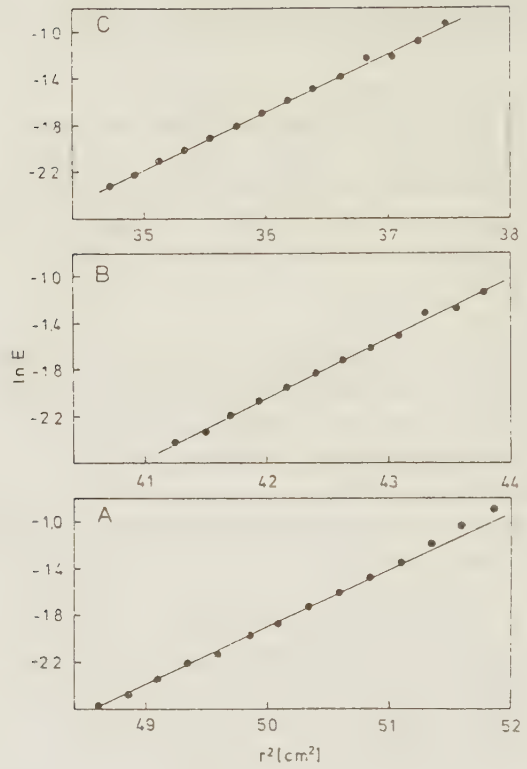


Abb. 16: Sedimentationsgleichgewichtsanalyse des Herzmuskel-Troponins bei den Metall(II)ionen-Konzentrationen: (A) 1 mM EGTA, (B) 10 mM $MgCl_2$ und (C) 2 mM $CaCl_2$

Für die Sedimentationsgleichgewichtsläufe wurde Troponin (0.41 mg/mL) in 0.5 M KCl, 50 m MOPS, pH 7.2, 1 mM DTE, 1 mM EGTA (± Metall(II)ionen) eingesetzt. Sie wurden in einer 6-Kanal-Zelle bei 20 °C und 9989 UpM nach 2.2.4.3. durchgeführt. Die Einstellung des Gleichgewichtes wurde mehrmals kontrolliert. Nach 48 Std. wurde die Proteinverteilung über die Zelle aufgezeichnet und nach 2.2.4.4. ausgewertet.

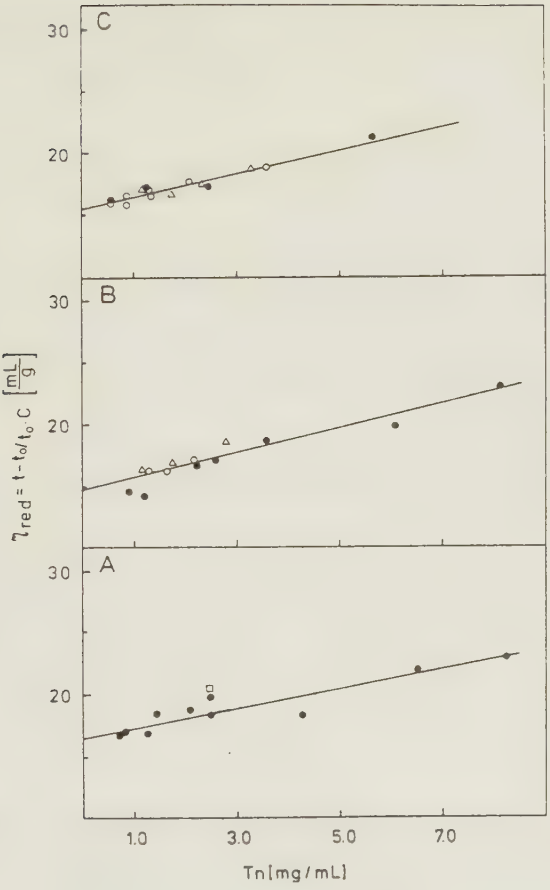


Abb 17: Abhängigkeit der reduzierten Viskosität η_{red} von der Proteinkonzentration; Bestimmung der intrinsischen Viskosität des Troponins

In den Teilabbildungen (A), (B) und (C) ist die reduzierte Viskosität η_{red} (= $(t-t_o)/t_o c$) gegen die Proteinkonzentration der eingesetzten Lösungen aufgetragen. Die Durchflußzeiten t und t_o wurden nach 2.2.5. bestimmt, die Proteinkonzentration nach 2.2.8.. Durch Extrapolation auf c = 0 mg/mL wurde die unkorrigierte, intrinsische Viskosität $[\eta]_L$ bestimmt; die intrinsische Viskosität $[\eta]$ wurde nach Gleichung (5) (2.2.5.) errechnet, die Dichtekorrektur betrug 0.25 mL/g.

(A): 1 mM EGTA-Puffer: $[\eta]$ = 16.4 mL/g

(B): 10 mM Mg^{2+}-Puffer: $[\eta]$ = 15.1 mL/g

(C): 2 mM Ca^{2+}-Puffer: $[\eta]$ = 15.9 mL/g

unendliche Proteinverdünnung erhält man den Wert $[\eta]_u$ für die Viskosität, der nach Gleichung (5) (Kap. 2.2.5.) für die Dichtekorrektur auf den Wert für die intrinsische Viskosität $[\eta]$ umgerechnet wird.
Die positive Steigung der Ausgleichsgeraden in den Teilabbildungen A-C (Abb. 17) weist auch in diesem Falle auf eine Proteinassoziation hin.
Die intrinsische Viskosität des Herzmuskel-Troponins beträgt für den EGTA-Puffer: 16.45 ml/g, für den 10 mM $MgCl_2$-Puffer: 15.05 ml/g und für den $CaCl_2$-Puffer: 15.85 ml/g.
Die Werte der intrinsischen Viskosität werden für die Berechnung der Simha-Faktoren und der ß-Faktoren eingesetzt (s. Kap. 3.7.4.).

3.7.3. Gelfiltration zur Bestimmung des Stokesschen Radius des Troponin-Komplexes

Abb. 18 gibt die Eichgerade für die Sephacryl-S 300 Säule wieder, über die der Stokessche Radius des Troponin-Komplexes bestimmt wurde. In Abb. 19 ist die Abhängigkeit des Stokesschen Radius von der Troponin-Konzentration dargestellt. Der Anstieg des Stokesschen Radius mit steigender Proteinkonzentration korrespondiert mit einer zunehmenden Aggregation des Troponin-Komplexes.
Der für unendliche Proteinverdünnung zu erwartende Stokessche Radius liegt zwischen 52 und 53 Å. Ein solcher Radius, der bei einem globulären Molekül einem Molekulargewicht von 250 000 D entsprechen würde, weist darauf hin, daß das Troponin als asymmetrischer Komplex vorliegt.
Die Gelfiltrationsexperimente im 1 mM EGTA-Puffer zeigen eine Besonderheit (Abb. 20): Das Elutionsprofil des Troponin-Komplexes ist asymmetrisch, auf einen Hauptgipfel, dessen Elutionsvolumen annähernd demjenigen in Gegenwart von Mg^{2+}- bzw. Ca^{2+}-Ionen entspricht, folgt ein zweiter Gipfel (als Schulter) mit deutlich geringerer Intensität. Die SDS-gelelektrophoretische Analyse der Proteine (s. Abb. 20) ergab, daß die Fraktionen des Hauptgipfels ausschließlich einen Komplex der Untereinheiten TnT und TnI enthalten, während im

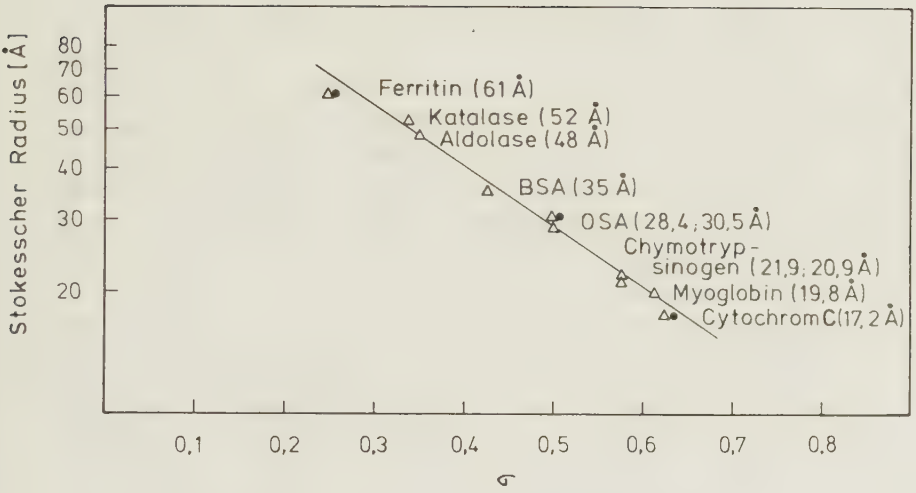


Abb. 18: Eichgerade für eine analytische 1.5/83 cm Sephacryl-Säule zur Bestimmung des Stokesschen Radius der eluierten Proteine an Hand des Verteilungskoeffizienten

Eine 1.5/83 cm analytische Sephacryl S 300 Säule wurde mit 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, pH 7.2, 1mM DTE, 1 mM EGTA (oder + 10 mM $MgCl_2$, oder + 2 mM $CaCl_2$) bei 20 °C äquilibriert. 3-4 Eichproteine wurden in 0.5 mL Puffer auf die Säule aufgetragen; die Durchflußgeschwindigkeit betrug 8.6 mL/h, das Fraktionsvolumen war 2.1 mL. Der Elutionsverlauf wurde über einen UV-Monitor (298-310 nm) verfolgt.
In einem halblogarithmischen Koordinatensystem wurde der Stokessche Radius des Gelfiltrationsstandards (Byers und Kay, 1982) gegen ihren Verteilungskoeffizienten aufgetragen.

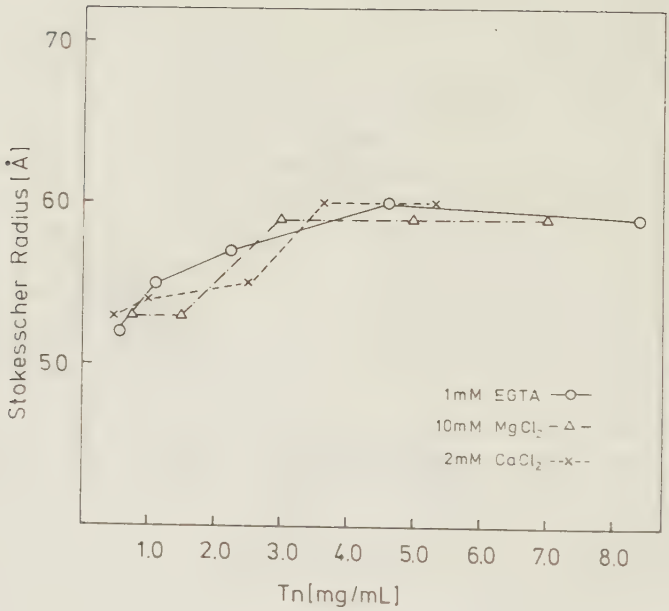


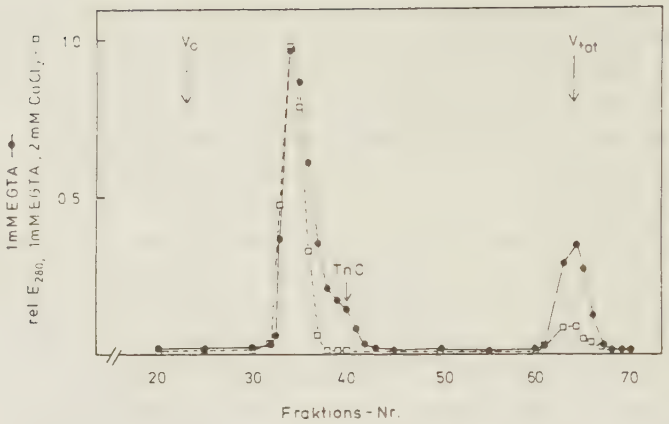
Abb. 19: Abhängigkeit des Stokesschen Radius des Phosphor-Troponins von der Proteinkonzentration der Aufgabelösung auf eine Gelfiltrationssäule und den Metallionenbedingungen des Äquilibrierungspuffers

Mittels der Eichgeraden für die analytische Gelfiltrationssäule (Abb. 18) wurden die app. Stokesschen Radien ermittelt, mit denen das Troponin von der Säule eluierte. Die Troponinproben waren vor dem Beginn der Gelfiltrationsläufe 24 Std. mit dem jeweiligen Elutionspuffer (s. Legende von Abb. 18) äquilibriert worden. Die Proteinbestimmung in den aufgegebenen Lösungen erfolgte nach 2.2.8..

zweiten Gipfel als Hauptanteil die TnC-Untereinheit neben geringen Anteilen der TnT- und TnI-Untereinheiten gefunden wurde Durch die Überlappung der beiden Elutionsgipfel ist das Vorhandensein der beiden größeren Troponin-Untereinheiten in diesem zweiten Gipfel zu erklären. Diese Abtrennung der TnC-Untereinheit gilt für sämtliche untersuchten Proteinkonzentrationen.
Im Gegensatz dazu zeigen Gelfiltrationsexperimente in Gegenwart von Mg^{2+}- oder Ca^{2+}-Ionen, daß jeweils der Gesamtkomplex aus allen drei Untereinheiten in einem symmetrischen Gipfel eluiert wird. Weder unter den EGTA-Bedingungen noch unter Zusatz von $MgCl_2$ oder $CaCl_2$ ist eine proteolytische Degradation der Troponin-Untereinheiten TnT oder TnI zu beobachten. Unter den in Kap. 2.2.6. geschilderten Bedingungen (hohe Salzkonzentration, relativ hohe Temperatur) wird der Gesamtkomplex durch die Metallionen stabilisiert. In Abwesenheit von Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Ionen kann die TnC-Untereinheit von dem eingesetzten Phosphotroponin abdissoziieren.
Daß der Restkomplex aus den Untereinheiten TnT und TnI mit einem dem Gesamtkomplex sehr ähnlichen Stokesschen Radius eluiert wird (52 - 53 Å), zeigt, daß die hydrodynamischen Eigenschaften des Troponin-Komplexes hauptsächlich durch diese beiden Untereinheiten bestimmt werden.

3.7.4. Berechnung der hydrodynamischen Parameter an Hand der Daten aus Ultrazentrifugationsläufen, Viskositätsbestimmung und Gelfiltrationsexperimenten

Der Anstieg der $S_{20,w}$-Werte, der Werte für die intrinsische Viskosität bzw. die Zunahme des Stokesschen Radius mit steigender Proteinkonzentration deuten darauf hin, daß das Troponin sich in einem Monomeren-N-meren Gleichgewicht befindet. Da aber die in dieser Arbeit ermittelten Werte weitaus stärker durch die Eigenschaften des Monomeren beeinflußt zu sein scheinen als die Ergebnisse einer vergleichbaren Untersuchung (Byers et al., 1979; s.a. Kap. 4.4.), wurde versucht, ein hydrodynamisches Modell des Troponins zu erstellen. Das so er-



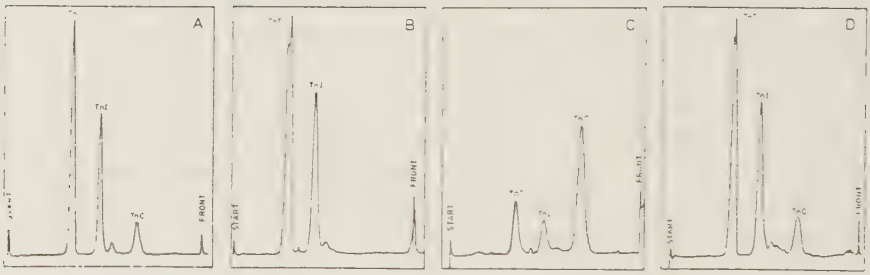


Abb. 20: Vergleich zwischen dem Elutionsprofil eines EGTA-Tn-Komplexes und eines Ca^{2+}-Tn-Komplexes bei der analytischen Gelfiltration

Für die Bedingungen der analytischen Gelfiltrationsexperimente s. Legende zu Abb. 18.
Die Beladungskonzentration für die Tn-Komplexe war:
EGTA-Tn: 4.6 mg/mL; Ca^{2+}-Tn: 5.3 mg/mL.
Der Pfeil deutet auf den Bereich der TnC-Elution unter den EGTA-Bedingungen.
Die SDS-Gele (nach Cohen, 2.2.3.1.) zeigen (A) EGTA-Tn, Auftraglösung für die Sephacryl S 300 Säule, (B) Aliquot aus dem Maximum des 1. Gipfels des EGTA-Laufes, (C) Aliquot aus dem 2. Gipfel des EGTA-Laufes, (D) Aliquot aus dem Maximum des Gipfels des Ca^{2+}-Laufes.

haltene Modell soll an Hand der daraus berechenbaren $S_{20,W}$-Werte für zwei Dimere des Troponins und durch den Vergleich mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Troponins überprüft werden.

3.7.4.1. Verknüpfung der Meßwerte mit den hydrodynamischen Parametern (nach Cantor und Schimmel, 1980; Byers und Kay, 1982)

Aus den Sedimentationskonstanten $S^o_{20,W}$, läßt sich der Stokessche Radius des Troponins ermitteln nach der Gleichung:

$$R_{s,Sed.} = M_r\ (1 - \bar{v}\varrho)/(6N_o\pi\eta_o S^o_{20,W}) \qquad (6)$$

wobei M_r das Molekuargewicht ($gMol^{-1}$), $\bar{v}$ das partielle spezifische Volumen des Proteins (mL/g), ϱ die Dichte des Lösungsmittels (g/mL), N_o die Avogadrosche Zahl (Mol^{-1}) und η_o die Viskosität des Lösungsmittels (Poise) ist. Dieser Wert stellt einen Vergleichswert zu dem Stokesschen Radius dar, der aus den Gelfiltrationsexperimenten ermittelt wird.
Die hydrodynamischen Eigenschaften eines Moleküls werden durch den Quotienten der Translationsreibungskoeffizienten f und f_m charakterisiert:

$$f/f_m = 6\pi\eta_o R_s/6\pi\eta_o R_o = R_s/(3M_r\bar{v}/(4\pi N_o))^{1/3} \qquad (7)$$

R_s ist der Stokessche Radius, der aus den Gelfiltrations- oder Sedimentationsexperimenten ermittelt wird, R_o stellt den Stokesschen Radius eines äquivalenten, globulär gedachten, nicht hydratisierten Proteins des Molekulargewichtes M_r dar. Dieser Quotient kennzeichnet den im Vergleich zu einem nicht hydratisierten Kugelmodell erhöhten Reibungswiderstand des untersuchten Moleküls in Lösung. Er läßt sich in zwei Anteile aufspalten: a) den Asymmetrieanteil (f/f_o), der die Erhöhung des Reibungswiderstandes auf Grund der von einer Kugel abweichenden Gestalt wiedergibt, und b) den Hydratationsanteil, der die Austauschprozesse zwischen Hydratwasser und Wassermolekülen des Lösungsmittels beinhaltet, letztlich die Vergrößerung der Moleküldimensionen durch Wasseranlagerung beschreibt:

Tabelle 11: Physikalische Parameter des Herzmuskel-Troponins[a)]

	1 mM EGTA	1 mM EGTA +2 mM $CaCl_2$	1 mM EGTA +10 mM $MgCl_2$
ρ_o (g/mL)[b)]	1.020	1.020	1.021
$\bar{v}$ (mL/g)[c)]	0.73	0.73	0.73
ω (gH_2O/g)[d)]	0.44	0.44	0.44
M_r (D)	77500	77500	77500
$s^o_{20,w}$ (S)	3.60(0.15)	3.70(0.10)	3.91(0.23)
$R_{s,Sed.}$ (Å)[f)]	48.5 (2.2)	47.3 (1.5)	44.2 (3.4)
$R_{s,Gel.}$ (Å)	52 (1.0)	53 (1.0)	53 (1.0)
f/f_m[g)]	1.88	1.88	1.88
f/f_o[h)]	1.61	1.61	1.61
$[\eta]$ (mL/g)	16.5 (0.7)	15.8 (0.5)	15.1 (0.5)
ν_a[i)]	14.2	13.6	13.0
$\beta \times 10^{-6}$[j)]	2.38	2.35	2.27
a/b:			
= $f(f/f_o)$[k)]	11:1	11:1	11:1
= $f(\nu_a)$[k)]	10.4:1	10.0:1	9.7:1
= $f(\beta)$[k)]	9:1	8:1	6:1

[a)]Die Messungen wurden bei 20 °C in 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, pH 7.2, 1 mM DTE bei den angegebenen Metall(II)ionen-Bedingungen durchgeführt. [b)]Die Dichten der Proteinlösungen wurden nach $\rho = \rho_o(1+\bar{v}c)$ berechnet. [c)]Berechnet aus der Aminosäurezusammensetzung nach Cohn und Edsall (1943). [d)]Berechnet aus der Aminosäurezusammensetzung nach Kuntz und Kauzmann (1974). [e)]Für eine 1:1:1 Stöchiometrie aus den Molekulargewichten der Untereinheiten TnT (35000 D), TnI (24000 D) und TnC (18500 D) berechnet. [f)]Berechnet nach Gleichung (6). [g)]Berechnet nach Gleichung (7). [h)]Berechnet nach Gleichung (8). [i)]Berechnet nach Gleichung (9). [j)]Berechnet nach Gleichung (10). [k)]Auf Grund tabellierter Werte bestimmt (Cantor und Schimmel, 1980).

$$f/f_m = f/f_o \; (1 + \omega/(\bar{v}\rho))^{1/3}. \qquad (8)$$

Hierbei gibt ω den Hydratationsgrad des Proteins (in g H_2O/g Protein) wieder.
Information über die Gestalt, d.h. über die Achsenverhältnisse in einem Ellipsoid-Modell, kann man auch durch die Bestimmung der intrinsischen Viskosität einer Substanz erhalten. Der Faktor ν_a, der sogenannte Simha-Faktor, läßt sich aus der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ nach der Gleichung berechnen:

$$[\eta] = \nu \; \bar{v} = \nu_a \; (1 + \omega/(\bar{v}\rho))\bar{v} \qquad (9)$$

Analog zu dem Quotienten der Reibungskoeffizienten läßt sich ν in einen Asymmetriefaktor ν_a und einen Hydratationsanteil $\nu_a \cdot \omega/\bar{v}\rho$ separieren.
Für die genaue Berechnung der Asymmetriefaktoren f/f_o und ν_a ist in beiden Fällen die Kenntnis der Proteinhydratation und des part. spez. Volumens notwendig. Der Hydratisierungsgrad ω und das part. spez. Volumen $\bar{v}$, die auf Grund der Aminosäurezusammensetzung bestimmt werden können (s. Tab. 11, Anmerkungen), stellen eine Möglichkeit dar, eine Abschätzung des Achsenverhältnisses in einem Modell-Ellipsoid für das Troponin zu erzielen. Eine andere, von der Kenntnis der Hydratation unabhängige Methode zur Bestimmung des Ellipsoid-Achsenverhältnisses ist durch die Scheraga-Mandelkern Gleichung zur Berechnung des ß-Faktors gegeben:

$$ß = (N_o(16200\ \pi^2))^{1/3}\ \nu^{1/3}/(f/f_m) \qquad (10)$$

Durch Auflösen der Gleichung (9) nach ν und Einsetzen in die Gleichung (10) erhält man einen Ausdruck, der unabhängig von der Hydratation und dem part. spez. Volumen des Proteins ist.
Der ß-Faktor läßt sich an Hand der Meßwerte $[\eta]$ und R_s (bzw. f/f_m) bestimmen; der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse liegt ein Minimal-Molekulargewicht von 77500 D zugrunde. Dem Vorteil dieser Bestimmungsmethode, durch zwei unabhängig von-

einander bestimmbare Größen wie der Viskosität und dem Translations-Reibungskoeffizienten einen 'Gestalt'-Parameter zu ermitteln, steht der Nachteil gegenüber, daß der ß-Faktor vergleichsweise insensitiv auf Gestaltänderungen reagiert. Die Ermittlung des ß-Faktors kann deshalb vornehmlich der Differenzierung zwischen einem gestreckten oder abgeflachten Ellipsoidmodell dienen; für ein gestrecktes Ellipsoidmodell ist darüber hinaus eine Abschätzung erlaubt, in welcher Größenordnung das Achsenverhältnis zu erwarten ist.

3.7.4.2. Bestimmung des Quotienten der Translationsreibungskoeffizienten

Nach Gleichung (7) läßt sich der Quotient der Reibungskoeffizient f/f_m bei Kenntnis des Stokesschen Radius berechnen. Neben den Ergebnissen aus den Gelfiltrationsexperimenten (Kap. 3.7.3.), die direkt den Stokesschen Radius ($R_{s,Gel.}$) des untersuchten Komplexes ergeben, kann nach Gleichung (6) auch aus den Sedimentationskonstanten $S^o_{20,W}$ der Stokessche Radius ($R_{s,Sed.}$) berechnet werden. In Tab. 11 sind die nach diesen unterschiedlichen Methoden bestimmten Stokesschen Radien aufgeführt; für die Berechnung der $R_{s,Sed.}$-Werte wurde ein Molekulargewicht von 77500 D eingesetzt. Der Vergleich zeigt, daß in Abhängigkeit von den $S^o_{20,W}$-Werten ein etwas niedrigerer $R_{s,Sed.}$-Wert als der $R_{s,Gel.}$-Wert berechnet wurde, wobei die Unterschiede für den Mg^{2+}-Troponinkomplex am größten sind. Für die Berechnung der $R_{s,Sed.}$-Werte wurde ein Wert von 0.73 mL/g für das partielle spezifische Volumen des Troponins eingesetzt, der auf Grund der Aminosäurezusammensetzung berechnet worden ist (Cohn und Edsall, 1943). Der tatsächliche Wert für $\bar{v}$ kann jedoch möglicherweise geringer sein, da Byers und Kay (1982b) für die TnC- und die TnI-Untereinheit kleinere Werte bestimmten (0.70 bzw. 0.72 mL/g); zumindest für die TnC-Untereinheit wich der von ihnen bestimmte Wert deutlich von dem aus der Aminosäuresequenz berechneten ab (Byers und Kay, 1982 a). Ein kleinerer Wert für $\bar{v}$, der auch zu kleineren $S^o_{20,W}$-Werten führen würde

(s. Gleichung (2)), könnte durchaus die Unterschiede für die $R_{s,Sed.}$- und $R_{s,Gel.}$-Werte der EGTA- und Ca^{2+}-Komplexe erklären. Für ein $\bar{\nu}$ = 0.72 mL/g errechnet sich z.B. ein $R_{s,Sed.}$-Wert von 50.4 Å. Die Differenz zwischen den R_s-Werten des Mg^{2+}-Troponinkomplexes erscheint allerdings für diese Erklärungsmöglichkeit zu groß, es sei denn, durch die Bindung der Mg^{2+}-Ionen würde sich das partielle spezifische Volumen im Vergleich zu den anderen untersuchten Komplexen ändern. Sicherlich trägt auch die größere Streuung der $S_{20,W}$-Werte des Mg^{2+}-Troponins zu dem größeren $S^o_{20,W}$-Wert, und damit zu dem kleineren $R_{s,Sed.}$-Wert bei.
Für die Berechnung des Translationsreibungskoeffizienten wurden nur die $R_{s,Gel.}$-Werte eingesetzt, da sie unabhängig von der Kenntnis des $\bar{\nu}$-Wertes bestimmt wurden. Nach Gleichung (7) errechnete sich damit der f/f_m-Wert zu 1.88 für alle $R_{s,Gel.}$-Werte. Der Asymmetrieterm f/f_o konnte daraus mit Hilfe der Gleichung (8) zu 1.61 berechnet werden. An Hand tabellierter Werte (Cantor und Schimmel, 1980) konnte für den f/f_o-Wert ein Achsenverhältnis von 11:1 für ein langgestrecktes Ellipsoid bestimmt werden.

3.7.4.3. Bestimmung des Simha-Faktors ν_a an Hand der Werte für die intrinsische Viskosität

Nach Gleichung (9) ist es möglich, aus den Daten für die intrinsische Viskosität der drei Troponinkomplexe (Kap. 3.7.2.) den Simha-Faktor ν_a zu berechnen, der als 'Formfaktor' die gesamte Information über die Gestalt eines äquivalenten Ellipsiodmodells enthält. Die Werte für ν_a zwischen 13 und 14 (s. Tab. 11) deuten darauf hin, daß der Troponinkomplex asymmetrisch ist. Die in Tab. 11 angegebenen Achsenverhältnisse wurden auf Grund dieser Werte den oben genannten Tabellen entnommen; sie zeigen keinen großen Unterschied untereinander. Auch auf Grund dieser Berechnung ist für das Troponin eine langgestrechte Struktur mit einem Achsenverhältnis von 10:1 zu erwarten.

3.7.4.4. Bestimmung des ß-Faktors nach der Scheraga-Mandelkern-Gleichung

Alternativ zu den zuvor beschriebenen Bestimmungen sollte mit Hilfe der Scherage-Mandelkerngleichung eine weitere Möglichkeit genutzt werden, eine Abschätzung des Halbachsenverhältnisses eines Troponinmodells zu erreichen. Der ß-Faktor wurde nach Gleichung (10) berechnet.
Für R_s = 52 Å und $[\eta]_{EGTA}$ = 16.5 mL/g errechnet sich daraus ein ß-Faktor von 2.38×10^6. Für die Werte der Ca^{2+}-Probe (53 Å/15.8 mL/g) ergibt sich ein ß-Faktor von 2.35×10^6, für die Mg^{2+}-Probe (53 Å/15. 1 mL/g) beträgt der ß-Faktor 2.27×10^6.
Alle ß-Faktoren liegen über 2.15×10^6, dem maximal möglichen Wert für ein abgeplattetes Ellipsoid. Die Werte sprechen vielmehr ebenfalls dafür, daß der untersuchte Troponinkomplex durch ein gestrecktes Ellipsoid darzustellen ist. Für die EGTA- und die Ca^{2+}-Probe lassen sich auf Grund der ß-Faktoren Achsenverhältnisse (9:1 bzw. 8:1) bestimmen, die mit den Werten auf Grund der Formfaktoren f/f_o und ν_a übereinstimmen. Das Achsenverhältnis von 6:1, das sich an Hand des ß-Faktors für die Mg^{2+}-Probe bestimmen läßt, deutet darauf hin, daß in dem Mg^{2+}-Puffer das Troponin möglicherweise in einer anderen Konformation vorliegt.

3.8. Entwicklung eines Ellipsoidmodells, das das hydrodynamische Verhalten des Troponins in Lösung beschreibt

Als Ergebnis der Gestaltanalyse, die in dem vorausgegangenen Kap. 3.7.4. an Hand der hydrodynamischen Parameter durchgeführt wurde, kann zusammenfassend festgestellt werden, daß das Herzmuskel-Troponin sich durch ein langgestrecktes Ellipsoid mit einem Achsenverhältnis von 10:1 darstellen läßt. Es läßt sich eine Abschätzung der effektiven Länge der Halbachsen a und b in einem solchen Ellipsoid erreichen, wenn die folgenden beiden Gleichungen gleichgesetzt werden, mit denen das Molekülvolumen eines hydratisierten Moleküls der Masse (M/N_o) und das Volumen eines gestreckten Ellipsoids mit der langen Halbachse a und der kurzen Halbachse b beschrieben werden:

$$V_h = (M/N_o)(\bar{v} + \omega/\rho_{Lösung})$$

und

$$V_E = 4\pi ab^2/3.$$

Mit M = 77500 D, $\bar{v}$ = 0.73 mL/g, ω = 0.44 g H_2O/g, $\rho_{Lösung}$ = 1.02 g/mL und a = 10b errechnet sich für die lange Halbachse ein Wert von a = 152.8 x 10^{-8}cm, für die kurze Halbachse b ein Wert von b = 15.3 x 10^{-8}cm. Das Herzmuskel-Troponin läßt sich danach in seinen hydrodynamischen Eigenschaften durch ein Ellipsoid mit 306 Å Länge und einer Dicke von 30.6 Å beschreiben.

Alle hydrodynamischen Untersuchungen dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß das Herzmuskel-Troponin bei höheren Proteinkonzentrationen aggregiert. Die für unendliche Proteinverdünnung abgeleiteten Moleküldimensionen (s.o.) sind dann keine adäquate Beschreibung des sich in Lösung befindenden Molekülkomplexes mehr.

Unter der Annahme, daß das monomere Troponin formstabil ist, bieten sich zwei extreme Formen der Aggregation als Möglichkeiten an: zum einen eine lineare, durch Kopf-Kopf- oder Kopf-

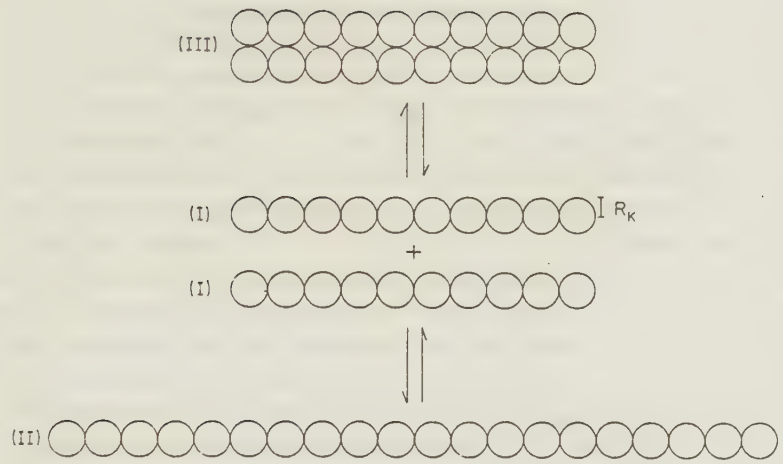
Schwanz-Polymerisation bewirkte Aggregation, zum anderen eine parallele Seitenlagerung der Troponinmoleküle. Welche Form der Aggregation möglicherweise beim Troponin erfolgt, soll dadurch abgeschätzt werden, welche Sedimentationskonstante $S_{20,W}$ für den jeweiligen Komplex berechnet werden kann. Als Anhaltspunkte dienen neben den in dieser Arbeit ermittelten Werten die Sedimetationsdaten von Byers et al. (1979), an Hand derer festgestellt werden kann, welche Werte für die Sedimentationskonstanten zu erwarten sind.
Die Sedimentationskonstante eines Oligomeren ($S_{Olig.}$) aus N kugelförmigen Monomeren läßt sich von der Sedimentationskonstanten des Monomeren ($S_{Mono.}$) herleiten, wenn das Verhältnis des Translations-Reibungskoeffizienten des Oligomeren ($f_{Olig.}$) zu dem des Monomeren ($f_{Mono.}$) bekannt ist:

$$\frac{S_{Olig.}}{S_{Mono.}} = \frac{M_{Olig.}}{M_{Mono.}} \quad \frac{f_{Olig.}}{f_{Mono.}} = N \quad \frac{f_{Olig.}}{f_{Mono.}} \qquad (11)$$

(Cantor und Schimmel, 1980).

Voraussetzung zur Berechnung der Sedimentationskonstanten $S_{Olig.}$ nach dieser Gleichung ist, daß das Oligomere und das Monomere das gleiche partielle spezifische Volumen besitzen.

Die Bestimmung des Reibungskoeffizienten $f_{Olig.}$ des Oligomeren kann nach dem Verfahren von J.G. Kirkwood und J. Riseman (1948) durchgeführt werden. Die von ihnen entwickelte Methode erlaubt es, durch die Aneinanderreihung oder Aneinanderlegung hydrodynamisch identischer Kugeln Komplexstrukturen anzunähern und deren Reibungskoeffizienten zu bestimmen.
Für die Analyse des Aggregationsverhaltens wird das Herzmuskel-Troponin durch eine Aneinanderreihung von 10 Kugeleinheiten mit einem Radius R_K dargestellt (s. Abb. 21 (I)). Die durch Aggregation entstandenen Dimeren werden durch die Aneinanderreihung von 20 Kugeln des gleichen Typs in der in Abb. 21 beschriebenen Weise erzeugt ((II) und (III)).
Der Quotient aus dem Reibungskoeffizienten f eines Modellmoleküls und dem Reibungskoeffizienten f_m der Kugeluntereinheit, aus der diese Modellsubstanz aufgebaut ist, läßt sich nach der folgenden Gleichung bestimmen:



	(I)	(II)	(III)
$f/f_m^{Kug.}$	3.41	5.61	3.58
f/f_m^{Gesamt}	1.85	2.42	1.54
$S^o_{20,w}$	3.6 - 3.91	4.38	6.86

Abb. 21: Modell zur Beschreibung der hydrodynamischen Eigenschaften des Troponins und seines Polymerisationsverhaltens

Auf Grund der Ergebnisse der hydrodynamischen Untersuchungen wurde das Troponinmolekül (I) durch eine starre Aneinanderreihung von 10 gleichen Kugeln dargestellt. Zur Abschätzung der Veränderung der Sedimentationskonstante durch Aggregation der Troponinmoleküle wurden die beiden extremen Fälle der Kopf-Schwanz-Polymerisation (II) und der parallelen Aggregation (III) ausgewählt. Für die Spezies (I-III) wurden die Reibungskoeffizienten f/f_m^{Kugel}, $f/f_m^{Gesamt.}$ sowie die apparente Sedimentationskonstante $S^o_{20,W}$(II) und $S^o_{20,W}$(III) berechnet.

f/f_m^{Kugel} = Zunahme des Reibungskoeffizienten f der Gesamtkette im Bezug auf den Reibungskoeffizienten f_m^{Kugel} der Kugeluntereinheit mit dem Radius R_K;

$f/f_m^{Gesamt.}$ = Zunahme des Reibungskoeffizienten f der Gesamtkette im Bezug auf den Reibungskoeffizienten $f_m^{Gesamt.}$ eines globulär gedachten Troponin-Monomeren (I) oder -Dimeren (II), (III) mit den Radien R_o;

$f/f_m^{Gesamt.} = f/f_m^{Kugel}/R_o^{Tn}/R_K$; R_K = 15.3 Å, R_o^{Tn} = 28.2 Å

für (I), 35.5 Å für (II) und (III);

$S^o_{20,W}$ (I): experimentell bestimmte Werte;

$S^o_{20,W}$ (II) und (III): Diese Werte wurden nach Gleichung (11) bestimmt, indem die f/f_m^{Kugel}-Werte der obigen Tabelle eingesetzt wurden; für $S_{Monomer}$ wurde ein Wert von 1.23 S eingesetzt, der nach Gleichung (11) aus dem f/f_m^{Kugel}-Wert des Monomeren (I) und dem experimentell bestimmten Wert von 3.6 S berechnet wurde.

$$\frac{f}{f_m} = N \left(1 + (1/N) \sum_i \sum_{j \neq i} \alpha_{i,j}^{-1}\right)^{-1} \qquad (12)$$

(N: Anzahl der kugelförmigen Untereinheiten, aus denen die Modellsubstanz aufgabaut ist; $a_{ij} = r_{ij}/R_K$, wobei R_K der Radius der Kugeluntereinheit ist und r_{ij} der Abstand der Untereinheiten untereinander, in Einheiten des Radius R_K. Bei der Summation über sämtliche Untereinheitsabstände ergibt sich, daß jeder Einzelabstand doppelt zu zählen ist, da die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten zu berücksichtigen sind.)

In der in Abb. 21 dargestellten Tabelle sind die nach den Gleichungen (11) und (12) berechneten Translations-Reibungskoeffizienten und die $S_{20,W}$-Werte angegeben (zur Erläuterung s. Legende zu Abb. 21). Der für das Modell des monomeren Troponins berechnete $f/f_m^{Gesamt.}$-Wert stimmt gut mit dem experimentell ermittelten Wert überein (s. Tab. 11, f/f_m), d.h. der nach Gleichung (12) berechnete f/f_m^{Kugel}-Wert beschreibt offensichtlich die hydrodynamischen Eigenschaften des Troponins gut. In entsprechender Weise wurden die Translations-Reibungskoeffizienten für die Dimeren (II) und (III) berechnet. Die für diese Modellsubstanzen ermittelten apparenten $S_{20,W}$-Werte unterscheiden sich deutlich voneinander.

Der Vergleich mit den experimentell bestimmten $S_{20,W}$-Werten dieser Arbeit zeigt, daß der für das lineare Dimere (II) berechnete Wert ab Proteinkonzentrationen zwischen 1.5 und 3.0 mg/mL überschritten wird; auch der weitere Verlauf der in Abb. 15 gezeigten Geraden weist auf eine noch nicht beendete Aggregation hin. Byers et al. (1979) beobachteten in ihrer Untersuchung einen steilen Anstieg der $S_{20,W}$-Werte bis auf 7.1 S im Bereich bis 3.0 mg/mL; erst bei höheren Proteinkonzentrationen fielen die $S_{20,W}$-Werte wieder ab. Der für das parallel aggregierende Dimere berechnete Wert für die Sedimentationskonstante entspricht eher den experimentell gefundenen Werten. Das legt den Schluß nahe, daß bei höheren Proteinkonzentrationen das Troponin in dieser Aggregationsform vorliegt.

3.9. ^{31}P-kernresonanzspektroskopische Untersuchungen am Phospho-Troponinkomplex

Zu jedem Stadium der Entwicklung des Troponin-Präprarationsverfahrens (s. Kap. 3.1.1.) wurden die so präparierten Troponinkomplexe auch ^{31}P-kernresonanzspektroskopisch untersucht. Die Qualität der ^{31}P-NMR-Spektren hinsichtlich Signal/Rauschen-Verhältnis und Signalstabilität spiegelte deutlich den Stand der Phosphatase-Inhibierung und -Abtrennung wieder. Erst Troponinproben, die nach dem in Kap. 2.1.1. angegebenen Verfahren präpariert worden waren, besaßen einen genügend hohen proteingebundenen Phosphatgehalt und waren frei von Phosphatase-Kontamination; sie konnten als Grundlage für reproduzierbare ^{31}P-NMR-Messungen dienen. Insgesamt sechs unterschiedliche Herzmuskel-Troponin-Präparationen wurden kernresonanzspektroskopisch untersucht, darunter Proben, die mit cAMP-abhängiger Proteinkinase (Kap. 2.1.8.1.(b)) oder alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Kap. 2.1.7.1.) inkubiert worden waren.

3.9.1. Identifizierung der Phosphorkernresonanzsignale

In Abb. 22.1 ist ein Übersichtspektrum wiedergegeben, daß einen ppm-Bereich von $\pm$ 100 ppm umfaßt. Es macht deutlich, daß nur im Bereich von 4-5 ppm eine Phosphorresonanz zu beobachten ist. Phosphoserin zeigt bei pH 7.2 in diesem Bereich seine Resonanz. Eine Kontamination durch andere, Phosphor-enthaltende Substanzen in einer Konzentration, die etwa 50 µM überschreitet, kann auf Grund dieses Spektrums ausgeschlossen werden.
Abbildung 22.2 (A,B) zeigt zwei NMR-Spektren, die nacheinander ohne bzw. mit Zusatz von Phosphoserin (0.05 mM) als internen Standard aufgenommen wurde. A stellt ein typisches Spektrum eines Mg^{2+}-Troponin-Komplexes bei einem pH-Wert von 7.2 dar: dicht nebeneinanderliegende Signale (4.39 und 4.26 ppm) mit geringer Linienbreite (3 Hz), das intensivere Signal zur

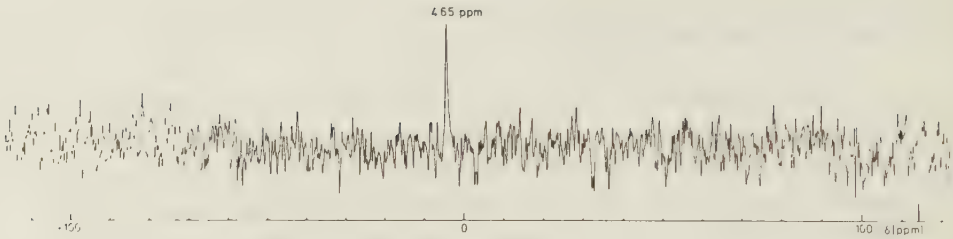
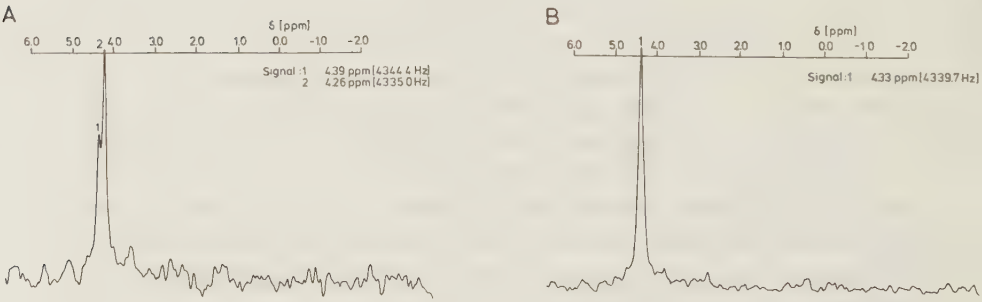


Abb. 22: Identifizierung der Phosphorkernresonanzsignale

^{31}P-NMR-Übersichtsspektrum bei 101.257 MHz einer Herzmuskel-troponin-Probe (25 mg/mL; in 95 % D_2O) mit einem Phosphatgehalt von 2.35 Mol P/77500 g Tn.

Meßbedingungen: 20 °C; 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, 2 mM DTE, pH 7.2;
28434 Scans, Linienverbreiterung (LB): 20 Hz, SW: 25000 Hz



^{31}P-NMR-Spektren bei 72.86 MHz einer Herzmuskel-Troponin-Probe (3.12 mg/mL) (2.69 Mol P /77500 g Tn);
Meßbedingungen: 20 °C; 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, 2 mM DTE, pH 7.2

(A) 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$ (26131 Scans);
(B) 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$, 0.05 mM Phosphoserin (14124 Scans).

Seite des höheren Feldes. Nach Zugabe eines Phosphoserin-Standards ist nur noch ein Signal (4.33 ppm) auszumachen. Der ca. 50fache molare Überschuß des Phosphoserins (in Bezug auf das Troponin) macht sich in dem deutlich verbesserten Signal/Rauschen-Verhältnis des Spektrums B mit etwa der Hälfte der Akkumulationszeit bemerkbar.

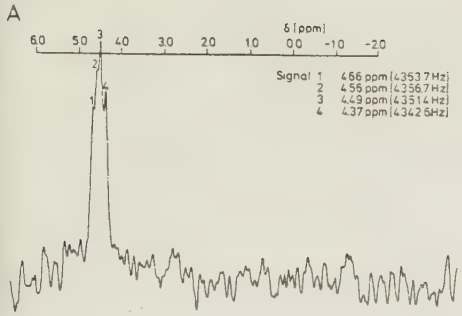
3.9.2. ^{31}P-NMR-Spektren des Herzmuskel-Troponins: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ^{31}P-NMR-Signale vom Metall(II)-ionen-Komplexzustand des Troponins

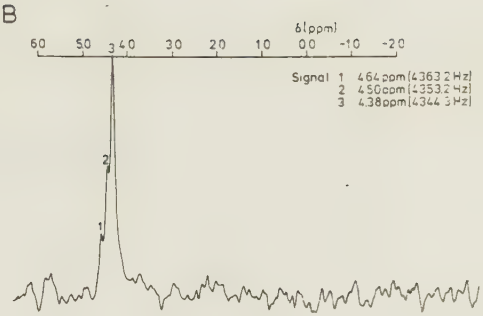
In der Serie A-F der ^{31}P-NMR-Spektren, die in Abb. 23. gezeigt werden, ist für einen Troponinkomplex (R 48) die Veränderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit vom Metallionen-Zustand des Troponin-Komplexes beobachtet worden.
Der Phosphatgehalt und die Verteilung auf die Untereinheiten ist in der Legende zu Abb. 23 angegeben.
Es ist deutlich zu erkennen, daß das breite Signal des Spektrums A durch eng beieinanderliegende, sich überlappende Signale (minimal 4 Signale) hervorgerufen wird. Die einzelnen Signale besitzen dabei jeweils eine geringe Linienbreite. Der Bereich von 4.66 - 4.37 ppm ist der Bereich der chemischen Verschiebung des Phosphoserins.
Spektrum B zeigt eine deutliche Veränderung der Signalkonturen: nach der Zugabe von Mg^{2+} wird das Spektrum apparent auf ein 3-Signal-Spektrum reduziert. Die chemische Verschiebung der jetzt zu beobachtenden Signale korreliert mit der dreier Signale aus Spektrum A (Signal A1-B1; A3-B2; A4-B3); das Signal bei 4.56 ppm aus dem Spektrum A erscheint offenbar nicht mehr.
Die Signalintensität in den Spektren A und B ist unterschiedlich (s. Tab. 12); die Intensität der jeweils größten Signale A3 und B3 ist nicht gleich, wie sich aus dem Vergleich mit den übrigen Signalen und mit dem Grundrauschen ergibt. Diese apparente Intensitätszunahme für das Signal 3 des Spektrums B kann durch die Überlagerung zweier Signale mit gleicher oder nahe beieinanderliegender chemischer Verschiebung hervorge-

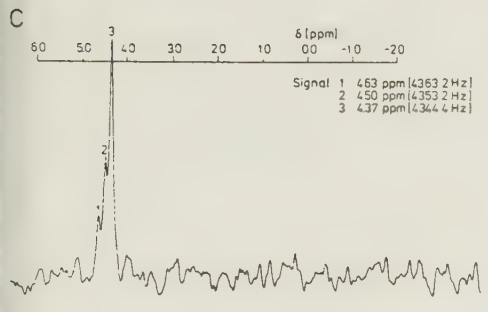
Abb. 23: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ^{31}P-NMR-Signale vom Metallionen-Komplexzustand des Troponins

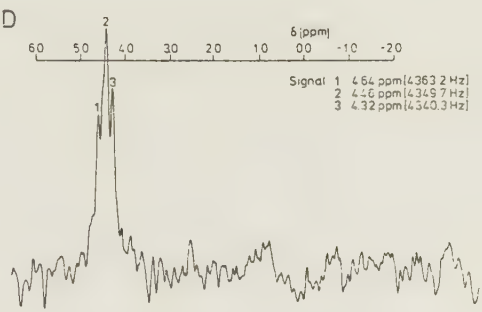
^{31}P-NMR-Spektren bei 72.86 MHz einer Herzmuskel-Troponin-Probe (5.9 mg/mL) mit einem Phosphatgehalt von 1.9 Mol P/77500 g Tn (0.5 Mol P/TnT, 1.3 Mol P/TnI).
Meßbedingungen: 20 °C; 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, 2 mM DTE, pH 7.25; LB: 5 Hz

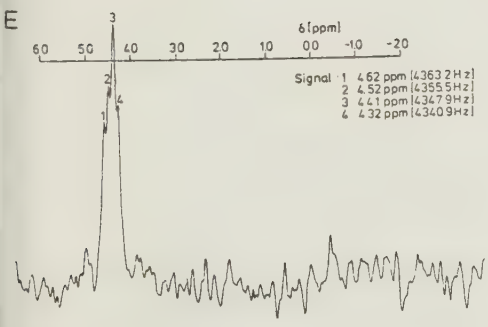
(A) 1 mM EGTA (19488 Scans);
(B) 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$ (22133 Scans);
(C) 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$ (19963 Scans);
(D) 1 mM EGTA (15078 Scans);
(E) 1 mM EGTA, 1.1 $CaCl_2$ (23975 Scans);
(F) 1 mM EGTA, 1.1 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$ (20320 Scans).

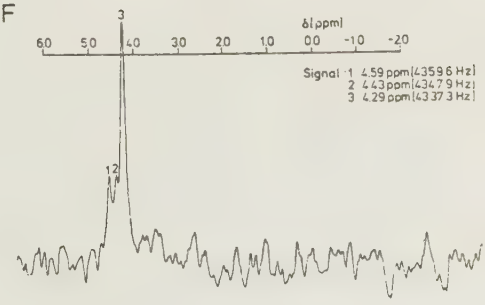

A
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.66 ppm (4353.7 Hz)
2 4.56 ppm (4356.7 Hz)
3 4.49 ppm (4351.4 Hz)
4 4.37 ppm (4342.6 Hz)


B
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.64 ppm (4363.2 Hz)
2 4.50 ppm (4353.2 Hz)
3 4.38 ppm (4344.3 Hz)


C
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.63 ppm (4363.2 Hz)
2 4.50 ppm (4353.2 Hz)
3 4.37 ppm (4344.4 Hz)


D
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.64 ppm (4363.2 Hz)
2 4.46 ppm (4349.7 Hz)
3 4.32 ppm (4340.3 Hz)


E
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.62 ppm (4363.2 Hz)
2 4.52 ppm (4355.5 Hz)
3 4.41 ppm (4347.9 Hz)
4 4.32 ppm (4340.9 Hz)


F
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.59 ppm (4359.6 Hz)
2 4.43 ppm (4347.9 Hz)
3 4.29 ppm (4337.3 Hz)

rufen werden. Das Verschwinden eines Signals im Vergleich zum Spektrum A könnte so erklärt werden (s. dazu Abschnitt 3.9.6.).

Die Zugabe von $CaCl_2$ zu der Mg^{2+}-Troponin-Probe (Spektrum C) zeigt keine Veränderung des ^{31}P-NMR-Spektrums im Vergleich zu dem der Mg^{2+}-Probe (Spektrum B). Die chemische Verschiebung der einzelnen Signale und ihre Linienbreiten stimmen überein. Durch Zugabe von EGTA und EDTA und anschließender Dialyse der Troponin-Probe gegen die Ausgangspufferlösung wurden die Ausgangsbedingungen für einen metallionenfreien Troponinkomplex wiederhergestellt. Spektrum D wurde nach einer 30-stündigen Dialyse (unter mehrmaligem Wechsel der Pufferlösung) aufgenommen. Trotz geringfügiger Unterschiede ist es gerechtfertigt anzunehmen, daß ein vergleichbarer Zustand wie für Spektrum A erreicht wurde. Die in den Spektren B und C erfolgten Veränderungen sind offensichtlich reversibel. Durch die etwas stärkere Überlagerung der zwei mittleren Signale erscheinen sie im Gegensatz zu Spektrum A als ein gemeinsames Signal bei 4.46 ppm (die Signalschulter an der Flanke zu niedrigerem Feld für Signal 2D ist aber gut zu erkennen). Die generelle, geringe Verschiebung zu höherem Feld im Spektrum D ist auf eine leichte pH-Erniedrigung zurückzuführen (pH 7.25 - 7.19).

Nach der Zugabe von Ca^{2+} zu dieser rückdialysierten Probe (1.1 mM $CaCl_2$) ergibt sich Spektrum E. Im Gegensatz zu der $MgCl_2$-Zugabe weist dieses Spektrum eine sehr viel größere Homologie zu dem Spektrum des metallionenfreien Troponinkomplexes auf. Deutlich sind 4 Signale zu erkennen, die ähnlich wie in den Spektren A und D dicht beieinanderliegen. Eine Intensitätsbestimmung für die einzelnen Signale wird dadurch erheblich erschwert, wenn nicht sogar unmöglich gemacht. Die chemische Verschiebung der einzelnen Signale korrespondiert mit denen der Spektren A und D.
Die Zugabe von $MgCl_2$ bis zu einer Konzentration von 10 mM führt offensichtlich zum gleichen Mg^{2+}-Ca^{2+}-Troponinkomplex (Spektrum E), wie er auch für Spektrum C vorgelegen hat. Die Reduktion auf apparent 3 Signale, wobei das intensivste Signal bei höchstem Feld offenbar durch Überlagerung zweier Signale entstanden ist, charakterisiert den Mg^{2+}-Troponinkomplex

Tabelle 12: Relative Intensitätswerte[a)] der Signale der ^{31}P-NMR-Spektren der Abb. 23 - 25

Versuchsbedingungen[c)]	Signal-Nummer[b)] 1	2	3	4
Abb. 23:				
A (1 mM EGTA)	20.9	20.9	32.8	25.4
B (+ 10 mM $MgCl_2$)	11.3	28.6	60.1	
C (+ 2 mM $CaCl_2$)	13.5	28.5	58.1	
D (1 mM EGTA)	20.9	54.1		25.0
E (+ 1.1 mM $CaCl_2$)	22.4	20.6	39.1	17.9
F (+ 10 mM $MgCl_2$)	21.4	19.3	59.1	
Abb. 24:				
A (1 mM EGTA)	64.4		35.6	
B (+ 10 mM $MgCl_2$)	20.5	35.7	43.7	
C (+ 2 mM $CaCl_2$)	27.7	34.0	38.3	
Abb. 25:				
A (1 mM EGTA)	31.2	42.3	26.5	
B (+ 2 mM $CaCl_2$)	18.2	26.6	33.9	21.2
C (+ 10 mM $CaCl_2$)	20.3	43.2		36.5
Abb. 26:				
A (pH 8.05)	35.3	64.7		
B (pH 7.73)	34.9	65.1		
C (pH 7.37)	33.5	66.5		
D (pH 7.00)	30.0	70.0		
E (pH 6.42)	38.9	36.9	24.2	
F (pH 6.15)	30.1	41.7	28.2	

a) Die Intensitätswertangabe erfolgt in % des Gesamtintegrals. Für die Spektren der Abb. 23, 24 und 26 wurden die Intensitätswerte durch Ausschneiden und Wiegen der Signale bestimmt. Die Intensitätswerte der Signale der Abb. 25 konnten dem Spektrometerprotokoll entnommen werden.

b) Die in den Abb. 23-26 angegebene Numerierung der Signale wurde beibehalten.

c) Die genauen Versuchsbedingungen sind den Legenden zu den Abb. 23-26 zu entnehmen.

bei dem vorliegenden pH-Wert (7.25). Im Vergleich zu den Spektren B und C zeigt das Signal 2 im Spektrum F eine geringere Intensität. In diesem Fall scheint ein Verlust durch Hydrolyse der Phosphat-Esterbindung eingetreten zu sein. Analyse des proteingebundenen Phosphates nach der NMR-Messung bestätigte diese Vermutung. Es wurden nach der NMR-Messung 1.65 Mol P/77500 g Tn bestimmt, ein Verlust von 0.23 Mol P (s. Tab. 6). Während für die TnT-Untereinheit ein gleicher Phosphatgehalt wie zu Beginn der NMR-Messungen bestimmt wurde, zeigte der Phosphatgehalt der TnI-Untereinheit einen entsprechenden Verlust. Die Troponinprobe ist ca. 100 Std. bei 20 ^{o}C in Lösung gehalten worden und war verschiedenen Manipulationen (wie pH-Messen und Nachstellen des pH-Wertes, Dialyse) unterworfen. Der Verlust in der Größenordnung von 12 % des Ausgangsphosphatgehaltes ist unter diesen Bedingungen zu tolerieren, da er offensichtlich die Reaktionen auf die Metallionenzugabe nicht beeinflußt (oder verfälscht).

3.9.3. ^{31}P-NMR-Spektren eines Troponinkomplexes, der durch Inkubation mit alk. Phosphatase aus Kälberdarm an der TnT-Untereinheit dephosphoryliert wurde

Als Vergleich zu den unter 3.9.2. genannten Messungen war, ausgehend von der gleichen Troponin-Präparation, eine zweite Probe gebildet worden, die allerdings vor den NMR-Messungen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm inkubiert worden war (Kap. 2.1.7.1.). Die Analyse des proteingebundenen Phosphates ergab eine Erniedrigung um 0.6 Mol P/77500 g Tn. Die Verringerung des Phosphatgehaltes war ausschließlich auf eine Dephosphorylierung der TnT-Untereinheit zurückzuführen, wie sich nach der Auftrennung in die Untereinheiten zeigte (s. Tab. 6; s.a. Abb. 11).
Ausgehend von dieser Troponinprobe sollte es möglich sein, das ^{31}P-NMR-Signal für die Phosphoseringruppe der TnT-Untereinheit aus dem Vergleich mit den unter 3.9.2. gezeigten Spektren zu bestimmen. Die NMR-Probe wurde in gleicher Weise wie die Vergleichsprobe vorbereitet; die NMR-Messungen er-

folgten unter identischen Bedingungen, beginnend mit einer Probe des metallionenfreien Dephospho-TnT-Troponinkomplexes. Abbildung 24 (A-C) zeigt die ^{31}P-NMR-Spektren dieses Komplexes, des Mg^{2+}-Troponinkomplexes und des Mg^{2+}-Ca^{2+}-Komplexes. Im Spektrum A wird der Unterschied zu dem Spektrum des TnT-phosphorylierten Troponinkomplexes deutlich: drei an Stelle von vier NMR-Signalen sind zu erkennen; der Vergleich zeigt, daß ein Signal zwischen 4.61 und 4.38 ppm fehlt. Die chemischen Verschiebungen der drei anderen Signale stimmen gut mit den drei restlichen Signalen des Spektrums A, Abb. 23 überein. Die Überlagerung der Signale 1 und 2 im Spektrum A, Abb. 24 verhindert eine genaue Ermittlung der Linienbreite, sie dürfte aber kaum über der Linienbreite für das Signal 3 liegen, die 3 Hz beträgt.
Zugabe von $MgCl_2$ verändert das Spektrum auf die in Abb. 24, B wiedergegebene Weise. Eine große Ähnlichkeit zu den Mg^{2+}-enthaltenden Komplexen der in Abb. 23 gezeigten Spektren fällt ins Auge: drei Signale, deren Intensitäten in Richtung auf höheres Feld zunehmen. Die Änderung der chemischen Verschiebung, besonders eine Verschiebung von 4.61 nach 4.44 ppm, erfolgt in Übereinstimmung mit den spektralen Veränderungen in den Spektren A-B, E-F, Abb. 23. Unterschiedlich bei dem Spektrum B, Abb. 24 ist allerdings die relative Intensität der ^{31}P-NMR-Signale zueinander. Das Signal 3 bei höchstem Feld ist zwar das intensivste Signal, dominiert aber bei weitem nicht so wie z.B. in den Spektren B,C oder F, Abb. 23, das entsprechende Signal. Spektrum C zeigt die Probe nach Zugabe von $CaCl_2$. Auch hier ist wieder die große Analogie zu dem entsprechenden Spektrum des Phospho-TnT-Troponinkomplexes (Abb. 23 (C)) zu erkennen, mit der Einschränkung, daß die Intensitätsverteilung nicht so extreme Unterschiede zeigt wie dort. Diese entsprechen denen des Spektrums B, Abb. 24. Die chemische Verschiebung zeigt geringfügige Veränderungen hin zu niedrigerem Feld im Vergleich zu diesem Spektrum, während die Linienbreite unverändert bei 3-4 Hz bleibt. Alle Signale der in Abb. 24 gezeigten Spektren repräsentieren ^{31}P-NMR-Signale der Phosphoseringruppen, die in der TnI-Untereinheit lokalisiert sind.

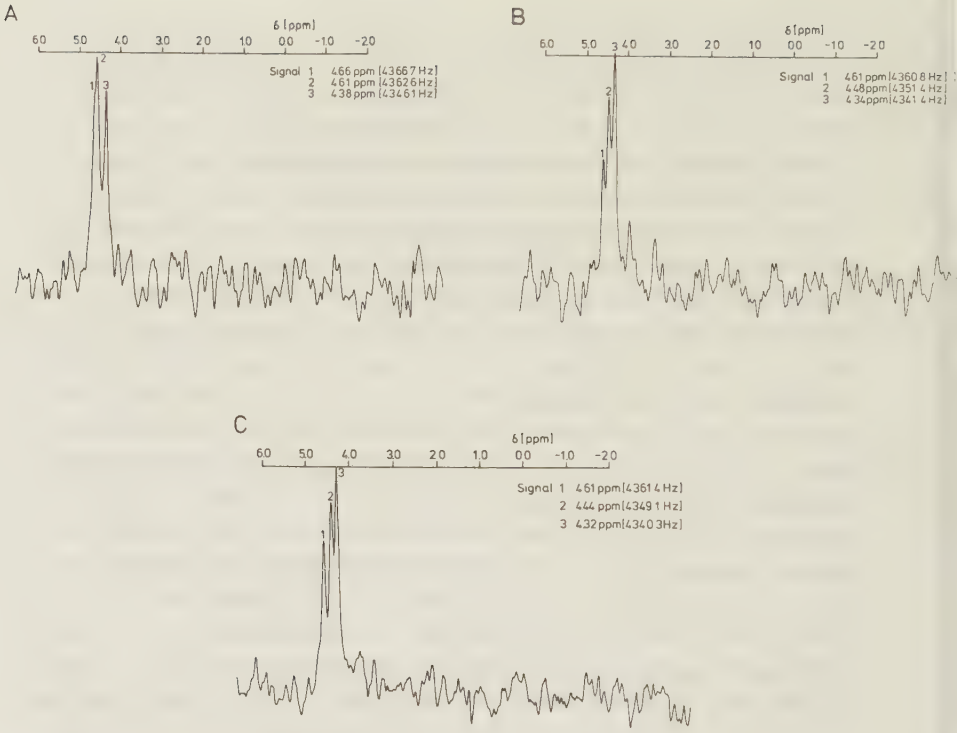


Abb. 24: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ^{31}P-NMR-Signale eines Dephospho-TnT-Komplexes vom Metallionen-Zustand des Troponins

^{31}P-NMR-Spektren bei 72.86 MHz eines Dephospho TnT-Herzmuskel-Troponin-Komplexes (6.7 mg/mL) mit einem Phosphatgehalt von 1.2 Mol P/77500 g Tn, präpariert nach 2.1.7.1..
Meßbedingungen: 20 °C; 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, 2 mM DTE, pH 7.25

(A) 1 mM EGTA (23918 Scans);
(B) 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$ (19621 Scans);
(C) 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$ (28714 Scans).

Obwohl für die TnT-Untereinheit verschiedene Phosphorylierungsseiten in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkinase bekannt sind, ist zumindest für die Skelettmuskel-Troponin-Untereinheit TnT allgemein akzeptiert, daß sie nach der Präparation nur an einer Seite, dem Serin-1, phosphoryliert ist. Auch das Serin-1 der TnT-Untereinheit des Herzmuskel-Troponins soll eine gleichartige Phosphorylierungsseite darstellen (Moir et Perry, 1982, private Mitteilung; Gusev et al., 1983). Die durchschnittlich für die TnT-Untereinheit in dieser Arbeit bestimmten Phosphatwerte liegen bei 0.7 Mol P/Mol TnT, mit maximalen Werten von 0.82 bis 0.86 Mol P. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der isoelektrischen Fokussierung, in der jeweils nur eine phosphorylierte Spezies der TnT-Isoformen gesehen wurde (Kap. 3.5.3.), kann man deshalb davon ausgehen, daß das proteingebundene Phosphat der TnT-Untereinheit in nur einer Seite lokalisiert ist (Serin-1). Die Entfernung dieses Phosphates durch die Inkubation mit alkalischer Phosphatase führt zum Verlust eines ^{31}P-NMR-Signals (vergleiche Abb. 23, 24, jeweils A).

Die Tatsache, daß für das TnT-dephosphorylierte Troponin dennoch 3 Signale registriert werden, steht der Beobachtung entgegen, daß nach der isoelektrischen Fokussierung maximal 2 phosphorylierte Seiten in der TnI-Untereinheit existieren, (s. Kap. 3.5.3.). 3 ^{31}P-NMR-Signale, die prinzipiell erst einmal 3 Phosphatgruppen in unterschiedlicher chemischer Umgebung repräsentieren, stehen nicht unbedingt in einem Widerspruch zu möglicherweise nur zwei Phosphatgruppen, dann nämlich nicht, wenn eine oder beide Phosphatgruppen in mehr als einer chemischen Umgebung, d.h. in unterschiedlichen Konformationen existieren können. Eine weitere Analyse dieses Problems und eine Darstellung verschiedener Erklärungsmodelle für diese Beobachtung erfolgen am Ende dieses Kapitels (s. Kap. 3.9.6.). Die Intensitätsverteilung der Signale ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

3.9.4. ^{31}P-NMR-Spektren eines Troponinkomplexes in Abhängigkeit von der Ca^{2+}-Ionen-Konzentration

Die Zugabe von $CaCl_2$-Lösung zu einer Troponinprobe, in der das Troponin sich in metallionenfreiem Zustand befindet, hat, wie mit den Spektren D und E (Abb. 23) gezeigt, zu einem sehr ähnlichen Spektrum wie dem des metallionenfreien Troponins geführt. Es konnte für diesen Fall apparent kein Unterschied zwischen diesen Spektren bestimmt werden, was hauptsächlich auf die Überlagerung der dicht beieinanderliegenden Signale in beiden Spektren zurückzuführen ist. Durch ^{31}P-NMR-Untersuchunggen bei einer Meßfrequenz von 101.3 MHz sollte versucht werden, eine bessere Auflösung der dicht beieinanderliegenden Signale zu erzielen. 2.5 mL Proben mit einer Proteinkonzentration von 25 mg/mL in D_2O-Puffer wurden eingesetzt. In Abb. 25 (A-C) sind die Spektren dieser Proben wiedergegeben.
Die relative Verschiebung der NMR-Signale zu niedrigerem Feld um etwa 0.15 ppm im Vergleich zu den NMR-Spektren im H_2O-Puffer dürfte auf den D_2O-Puffer zurückzuführen sein. Die drei Signale im Bereich von 4.78-4.65 ppm (Abb. 25 A) korrespondieren mit den drei Signalen bei höherem Feld in den Vergleichsspektren A und D, Abb. 23. Die relativen Intensitäten dieser drei Signale sind in Tab. 12 wiedergegeben. Der Versuch der Zuordnung der Signale zu entsprechenden Phosphatseiten in den Troponin-Untereinheiten TnT und TnI erfolgt in einem späteren Kapitel (3.9.6.).

Nach der Zugabe von $CaCl_2$(2 mM) und entsprechender Äquilibrierungsdialyse erhält man das in Abb. 25 B wiedergegebene Spektrum. Im Gegensatz zu dem Spektrum des metallionenfreien Komplexes zeigt dieses 4 Signale. Das Spektrum entspricht, abgesehen von der besseren Trennung der Signalspitzen, dem Ca^{2+}-Troponin-Spektrum, das in Abb. 23, E gezeigt wurde. Das neu hinzugekommende Signal in der Abb. 25 B scheint Signal 1 zu sein, das Signal bei niedrigstem Feld. Während alle anderen Signale relativ zu denen des Spektrums A, Abb. 25 zu höherem Feld verschoben sind, was für eine Erhöhung des Protonierungsgrades der Phosphatgruppen spricht, erscheint dieses Signal bei tieferem Feld. Es entspricht mit diesem Verhalten dem Signal 1 der in Abb. 23, A, D, E gezeigten ^{31}P-NMR-Spektren, allerdings um den

oben erwähnten D_2O bedingten Betrag zu tieferem Feld verschoben. Auch die Erhöhung der $CaCl_2$-Konzentration auf den (unphysiologisch hohen) Wert von 10 mM ergibt keine grundlagende Änderung des Spektrums, wie Abb. 25, C zeigt. Trotz der vergleichsweise geringen Auflösung (LB = 3 Hz) ist die Überein-

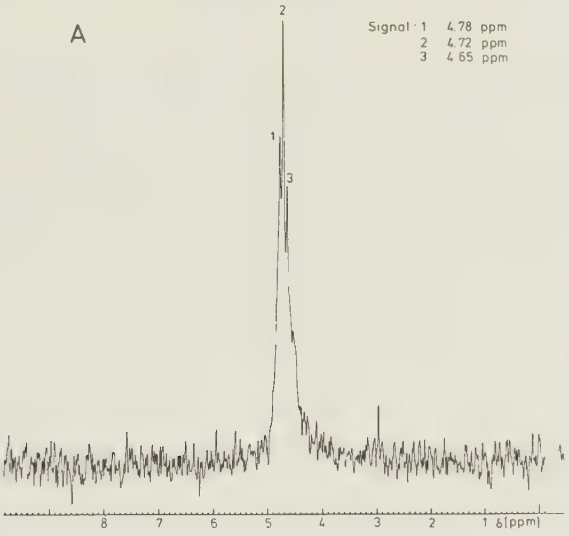
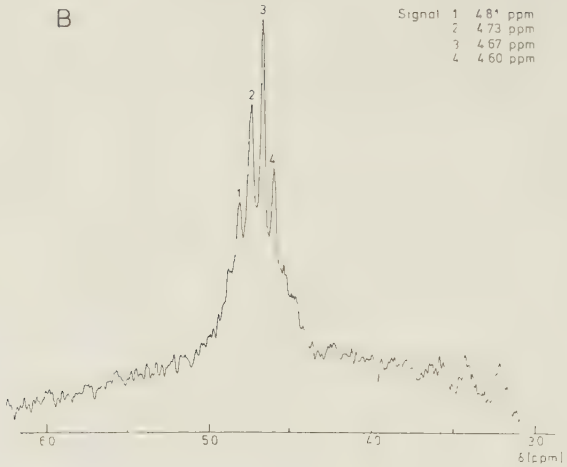
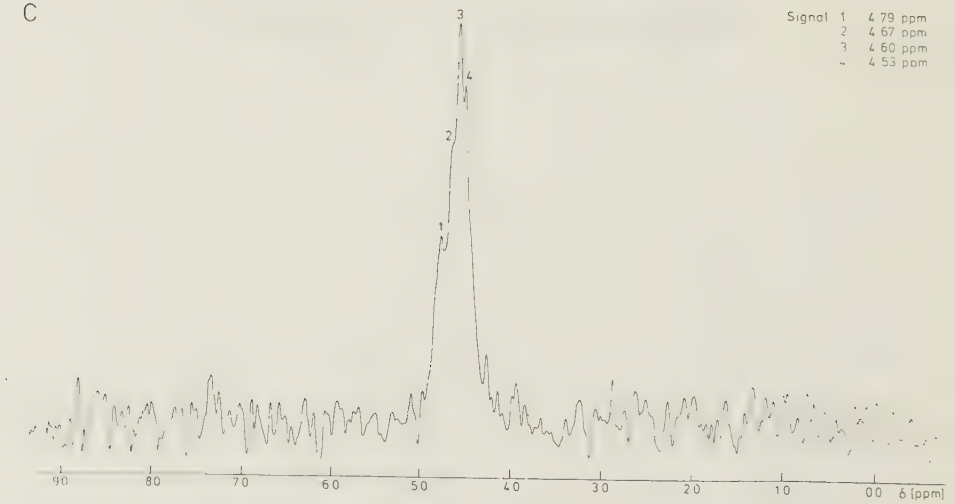


Abb. 25: Ca^{2+}-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ^{31}P-NMR-Signale eines Troponin-Komplexes; Aufnahme der Spektren mit einem Bruker 101.257 MHz-Gerät in D_2O

Die ^{31}P-NMR-Spektren bei 101.257 MHz einer Herzmuskel-Troponin-Probe (25 mg/mL) in D_2O mit einem Phosphatgehalt von 2.35 Mol P/77500 g Tn (0.8 Mol P/TnT, 1.5 Mol P/TnI). Meßbedingungen: 20 °C; 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, 2 mM DTE, pH 7.2

(A) 1 mM EGTA (56337 Scans, LB: 1 Hz, SW: 2000 Hz)
(B) 1 mM EGTA, 2 mM $CaCl_2$ (68709 Scans, LB: 1 Hz, SW: 1201 Hz)
(C) 1 mM EGTA, 10 mM $CaCl_2$ (17372 Scans, LB: 3 Hz, SW: 1201 Hz)


B
Signal 1 4.8* ppm
2 4.73 ppm
3 4.67 ppm
4 4.60 ppm
1
2
3
4
60
50
40
20
δ [ppm]


C
Signal 1 4.79 ppm
2 4.67 ppm
3 4.60 ppm
4 4.53 ppm
1
2
3
4
90
80
70
60
50
40
30
20
10
00
δ [ppm]

stimmung mit den Spektren B, Abb. 25 und E, Abb. 23 zu erkennen. Die größere Differenz zwischen der chemischen Verschiebung des Signals 1 und der der übrigen Signale ergibt sich aus einer geringen Erniedrigung des pH-Wertes, auf die Signal 1 offensichtlich weniger sensibel reagiert.

3.9.5. pH-Abhängigkeit der ^{31}P-NMR-Signale des Herzmuskel-Troponins

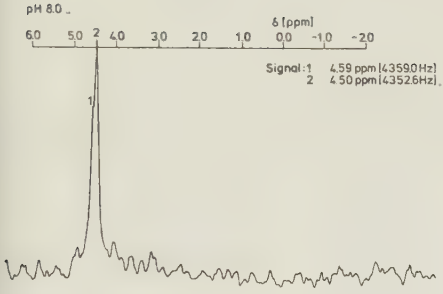
Bei der Aufnahme der NMR-Spektren war die hohe Empfindlichkeit festgestellt worden, mit der die ^{31}P-NMR-Signale auf nur leichte Veränderungen des Lösungs-pH-Wertes reagieren.
Auf Grund der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen, die für die einzelnen NMR-Signale festgestellt werden, ist anzunehmen, daß die chemische Umgebung der verschiedenen Phosphoserine im Troponin nicht identisch ist. Die Reaktion der einzelnen Phosphatgruppen kann deshalb umgebungsbedingt auf Änderungen des pH-Wertes unterschiedlich ausfallen. Um dies zu testen, wurde ein (partielles) pH-Profil im Bereich von pH 6.00 bis 8.00 aufgenommen. Die Begrenzung des Meßbereiches auf diese pH-Werte ergab sich daraus, daß eine Präzipitation des Troponins im saureren Bereich vermieden werden sollte. Durch die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der NMR-Signale ist eine weitere Möglichkeit der Differenzierung der Signale gegeben.
Abb. 26 zeigt die sechs Spektren in der Reihenfolge von hohen zu niedrigen pH-Werten. In Abb. 27 ist die chemische Verschiebung der NMR-Signale in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung aufgetragen; als Vergleichswerte sind in dieser δ/pH-Auftragung die chemischen Verschiebungen von freiem Phosphoserin und freiem Phosphothreonin mit in das Diagramm eingetragen worden.
Für die Messung der pH-Abhängigkeit wurde der Troponinkomplex in seiner Mg^{2+}-gebundenen Form eingesetzt (10 mM $MgCl_2$). Weitere Meßbedingungen sind in der Legende zu Abb. 26 angegeben.

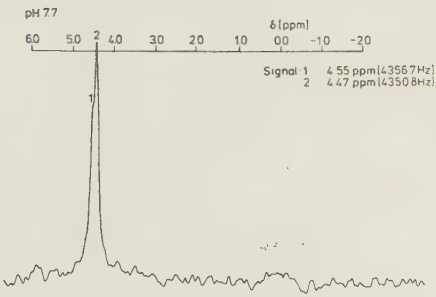
Abb. 26: pH-Abhängigkeit der ^{31}P-NMR-Signale eines Mg^{2+}-gesättigten Phosphotroponinkomplexes

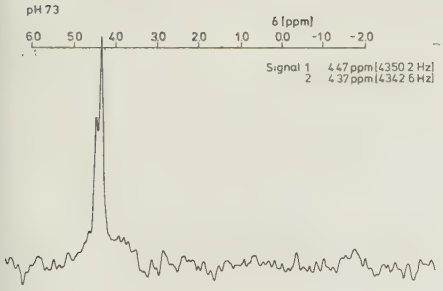
^{31}P-NMR-Spektren bei 72.86 MHz eines Herzmuskel-Troponin-Komplexes (5.9 mg/mL) in seiner Mg^{2+}-gesättigten Form mit einem Phosphatgehalt von 2.25 Mol P/77500 g Tn (0.6 Mol P/TnT, 1.6 Mol P/TnI).

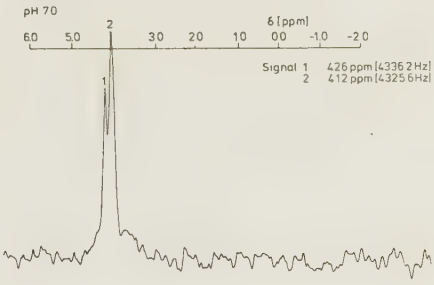
Meßbedingungen: 20 °C; 0.5 M KCl, 50 mM MOPS, 2 mM DTE, 1 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$

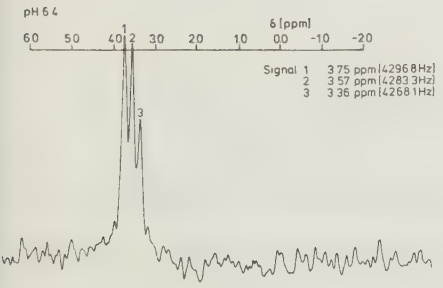
(A) pH 8.05 (30226 Scans);
(B) pH 7.73 (31281 Scans);
(C) pH 7.37 (11487 Scans);
(D) pH 7.00 (18025 Scans);
(E) pH 6.42 (18313 Scans);
(F) pH 6.15 (13322 Scans).

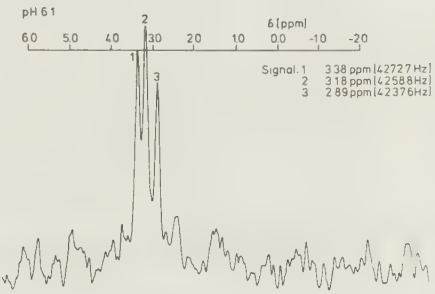

pH 8.0
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.59 ppm (4359.0 Hz)
2 4.50 ppm (4352.6 Hz)


pH 7.7
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.55 ppm (4356.7 Hz)
2 4.47 ppm (4350.8 Hz)


pH 7.3
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.47 ppm (4350.2 Hz)
2 4.37 ppm (4342.6 Hz)


pH 7.0
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 4.26 ppm (4336.2 Hz)
2 4.12 ppm (4325.6 Hz)


pH 6.4
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 3.75 ppm (4296.8 Hz)
2 3.57 ppm (4283.3 Hz)
3 3.36 ppm (4268.1 Hz)


pH 6.1
δ [ppm]
6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0 0.0 -1.0 -2.0
Signal 1 3.38 ppm (4272.7 Hz)
2 3.18 ppm (4258.8 Hz)
3 2.89 ppm (4237.6 Hz)

Für die Bedingungen im alkalischen Bereich gilt offensichtlich, daß die chemische Umgebung der Phosphoserin-Gruppen immer ähnlicher wird, d.h. keine oder nur gleichartige Wechselwirkungen treten auf. Im pH-Bereich oberhalb von 7.5 ist der Unterschied zwischen den einzelnen ^{31}P-NMR-Signalen so gering, daß das Spektrum fast auf 1 Signal mit etwas größerer Linienbreite (9 Hz) reduziert wird. Eine Schulter auf der Seite zu niedrigerem Feld deutet darauf hin, daß dieses Signal durch Überlagerung mehrerer Signale entstanden ist. Die relativ hohe Signalintensität (gutes Signal/Rauschen-Verhältnis) deutet ebenfalls in diese Richtung.
Eine Erniedrigung des pH-Wertes (pH 7.3, 7.0) ergibt 2-Signal-Spektren (Abb. 26, C,D), die, abgesehen von der Tatsache, daß ein Signal bei noch niedrigerem Feld fehlt, eine große Ähnlichkeit mit den Mg^{2+}-Troponin-Spektren der anderen untersuchten Troponinkomplexe zeigen (s. Abb. 23, B und C; Abb. 24, B und C).
Die Erniedrigung des pH-Wertes auf 7.0 führt neben einer weiteren Trennung der zu beobachtenden NMR-Signale zu einer ins Auge fallenden Vergrößerung der Linienbreite des rechten Signals (bei höherer Feldstärke). Der Vergleich mit dem nachfolgenden Spektrum bei pH 6.4 (Abb. 26, E) liefert die Erklärung für dieses Verhalten: bei niedrigeren pH-Werten als 7.0 ergibt sich ein 3-Signal-Spektrum dadurch, daß zur Seite des höheren Feldes ein neues Signal mit geringerer Intensität erscheint. Alle drei Signale zeigen wiederum eine gleiche Linienbreite von etwa 5 Hz. Die pH-Erniedrigung bewirkt offensichtlich eine weitere Trennung von zwei sich überlagernden Signalen, die bei pH-Werten oberhalb von pH 7.2 als ein Signal geringer Linienbreite erscheinen. Bei pH 7.0 äußert sich diese Trennung, d.h. die unterschiedliche Veränderung der chemischen Umgebung für diese Phosphatgruppen in Abhängigkeit vom pH der Lösung, in einer Vergrößerung der Linienbreite des noch gemeinsam gebildeten Signals. Bei pH 6.4 und pH-Werten darunter ist dann eine vollständige Separierung der ^{31}P-NMR-Signale gegeben.
Die Auftragung der chemischen Verschiebung der einzelnen Signale in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösung (Abb. 27)

zeigt deutlich, daß mit der Erniedrigung des pH-Wertes die Änderung der chemischen Verschiebung unterschiedlich verläuft. Das Signal bei höherer Feldstärke zeigt einen deutlich steileren Kurvenverlauf als die beiden anderen Signale oder zum Beispiel der Vergleichsstandard Phosphoserin. Dieses Verhalten könnte für eine Beeinflussung durch eine andere, protonenbindende Gruppe sprechen.
Die Erhöhung der Protonenkonzentration führt im ^{31}P-NMR-Spektrum zu einer generellen Verschiebung der ^{31}P-NMR-Signale zu höherem Feld, d.h. die Erhöhung des Protonierungsgrades an den Phosphatgruppen bewirkt eine stärkere Abschirmung des Phosphorkerns, so daß die Resonanzfrequenz erst bei höherem Feld auftritt. Eine Bindung der Protonen an die Phosphatgruppe zeigt sich an Hand der erhöhten Linienbreiten im Bereich niedriger pH-Werte (6-7 Hz) (s. Tab. 13).

Tabelle 13: Linienbreite der ^{31}P-NMR-Signale der Troponinprobe der Abb. 26 in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösung[a)]

pH der Probe	Signal-Nummer 1	2	3
8.05	9 Hz[b)]		
7.73	10 Hz[b)]		
7.37	3 Hz	3 Hz[c)]	
7.00	4 Hz	8 Hz[c)]	
6.42	5 Hz	6 Hz	5 Hz
6.15	6 Hz	7 Hz	6 Hz

a) Die genauen Versuchsbedingungen sind in der Legende zu Abb. 26 angegeben; die Numerierung der Signale der Abb. 26 wurde beibehalten.

b) Apparente Linienbreite des aus allen drei Signalen gebildeten Gesamtsignals.

c) Apparente Linienbreite, die durch die Überlagerung zweier Signale entstanden ist.

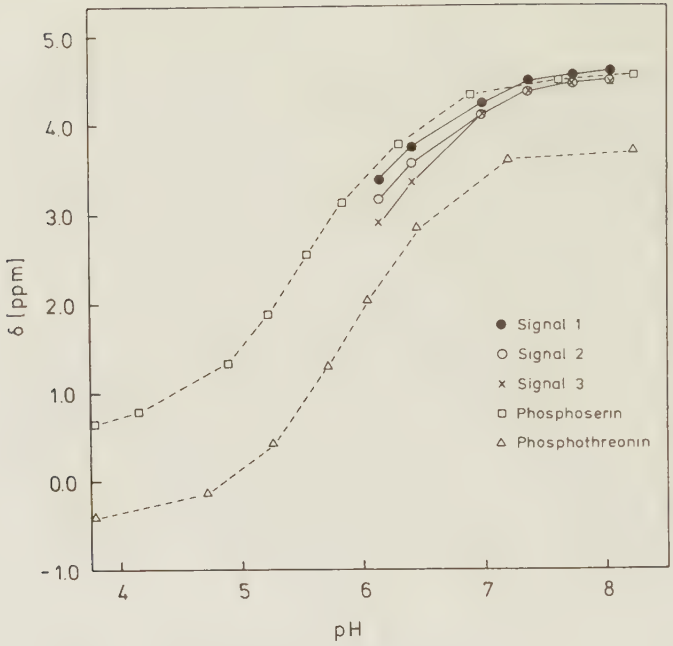


Abb. 27: pH-Titration der Phosphoseryl-Gruppen des Herzmuskel-Troponins

Die chemische Verschiebung der in Abb. 26 gezeigten ^{31}P-NMR-Signale ist in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers aufgetragen. Als Vergleich sind die Werte für Phosphoserin und Phosphothreonin mit in das Diagramm eingetragen.

3.9.6. Auswertung der NMR-Daten

3.9.6.1. Identifizierung der Phosphorresonanz-Signale

Das für das Herzmuskel-Troponin gefundene proteingebundene Phosphat liegt nur in Form des Phosphorsäureesters des Serins vor (Abb. 22.2). Weder für Phosphothreonin noch für eine andere Phosphoaminosäure konnte ein Resonanzsignal festgestellt werden. Es kann darüberhinaus ausgeschlossen werden, daß irgendwelche anderen phosphortragenden Substanzen, wie etwa assoziierte Nukleotide, DNA oder RNA in nennenswerter Konzentration als Verunreinigung in den Troponinproben vorgelegen haben (s. Abb. 22).

3.9.6.2. Bestimmung der allgemeinen Korrelationszeit τ_c der untersuchten Phosphorkerne

Vogel et al. (1982) geben für die Abhängigkeit der Linienbreite von dem Quadrat der Meßfrequenz (bei anisotropem Relaxationsmechanismus) folgende Gleichung an:

$$\pi\Delta\nu = \frac{4}{45}\,\omega_p{}^2\,(\Delta\sigma)^2\,(1 + \frac{\eta^2}{3})\,\tau_c \qquad (13)$$

Hierbei bezeichnet $\Delta\nu$ den von der chemischen Relaxationsanisotropie stammenden Beitrag zur Linienbreite ($\Delta\nu = \Delta\nu_{gem}$ (gemessene Linienbreite) - $\Delta\nu_{Dipol\text{-}Dipol}$; $\Delta\nu_{Dipol\text{-}Dipol}$ = frequenzunabhängiger Beitrag zur Linienbreite durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung), ω_p ist die Meßfrequenz (des Spektrometers) x 2π, der Ausdruck $(\Delta\sigma)(1 + \eta^2/3)^{1/2}$ ist der Anistropieterm und τ_c die allg. Korrelationszeit des untersuchten Kerns. Mit einigen, im folgenden genannten Annahmen läßt sich daraus die allgemeine Korrelationszeit τ_c des beobachteten Kerns berechnen. Für den Beitrag der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zur Linienbreite wurde, nach einer Untersuchung von Vogel und Bridger (1982) am phosphorylierten Hühnerserumalbumin, ein Wert von 1 bzw. 2 Hz (s.u.) eingesetzt. Der Anisotropieterm für Phosphoserin wurde in Analogie zu den Untersuchungen am Ovalbumin und an der Phosphorylase a zu 110 ppm angenommen (Vogel et al., 1982).
Die allg. Korrelationszeit τ_c berechnet sich dann, je nachdem, ob man $\Delta\nu$ = 3 Hz (gemessener Wert bei pH 7.2, s. Tab. 12), 2 Hz (- Dipol-Dipol-Beitrag von 1 Hz) oder 1 Hz (- Dipol-Dipol-Beitrag von 2 Hz) einsetzt, zu: 13.9, 9.2 bzw. 4.6 ns.

Man kann auf eine Assoziation des Kerns an das Gesamtmolekül schließen, wenn diese allgemeine Korrelationszeit mit der Rotationskorrelationszeit des Gesamtmolekül übereinstimmt. Nach der Debye-Einstein-Gleichung ist die allgemeine Rotationskorrelationszeit eines globulären Moleküls abhängig von seinem Stokesschen Radius:

$$\tau_c = 4\pi\eta r^3/3kT \qquad (14)$$

(η: Viskosität der Lösung (Poise); r: Stokesscher Radius (m); k = Boltzmann-Konstante; T = absolute Temperatur (K)) (James, 1975; Vogel et al., 1982).
Für ein globulär gedachtes, hydratisiertes Troponinmolekül (MG: 77500 D) errechnet sich nach der Gleichung:

$$r = \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N}\,(1 + \omega/\varrho\bar{v})\right)^{1/3} \qquad (15)$$

$\bar{v}$: part. spez. Volumen; ω: Hydratation des Moleküls;
ϱ: Dichte der Lösung
ein Stokesscher Radius von 32.9 Å. Mit diesem Wert ergibt sich eine allgemeine Rotationskorrelationszeit von τ_c = 36.9 ns. Auf Grund der hohen Proteinkonzentration wird das Troponin in den NMR-Experimenten vermutlich als Dimeren-Komplex vorgelegen haben (Kap. 3.8.), d.h. die Rotationskorrelationszeit wird sich verdoppeln.
Der Vergleich mit den nach Gleichung (13) berechneten Korrelationszeiten zeigt deutlich, daß die untersuchten Phosphorkerne eine hohe Mobilität besitzen und eine vom Gesamtmolekül unabhängige Relaxation durchführen.
Der nach Gleichung (14) errechnete Wert kann aber nur ein Anhaltspunkt für die wahre Korrelationszeit des Gesamtmoleküls sein, da auf Grund der hydrodynamischen Untersuchungen bekannt ist, daß das Troponin eine starke Abweichung von einem globulären Partikel aufweist und eher durch ein langgestrecktes Ellipsoid dargestellt werden kann (Kap. 3.7.4.). Der Rotationsreibungskoeffizient für eine Bewegung um die lange Halbachse ist bedeutend kleiner als für die Bewegung um die kurze Halbachse, wobei der Unterschied mit der Zunahme des Achsenverhältnisses immer deutlicher wird. Generell gilt aber, daß die Korrelationszeiten für gestreckte Moleküle größer sind als die der korrespondierenden glöbulären Moleküle (James, 1975). Die zu erwartendende, reale Korrelationszeit des Troponins sollte deshalb noch höher liegen als die nach Gleichung (14) berechneten.

Die Zunahme der Linienbreite bei Erniedrigung des pH-Wertes (Tab. 13) ist auf eine Vergrößerung des Dipol-Dipol-Wechselwirkungsbeitrages durch die Bindung eines Protons zurückzuführen.

Neben der freien Drehbarkeit der Phosphatgruppen, die nicht dafür spricht, daß sie in Salzbrücken fixiert sind, deutet auch die direkte Reaktion der Phosphatgruppen auf die pH-Änderungen der Lösung darauf hin, daß sie an der Oberfläche des Moleküls lokalisiert sind.

3.9.6.3. Zuordnung der ^{31}P-NMR-Signale zu Phosphorylierungsseiten des Troponins

Wenn auch in einigen Fällen eine genaue Bestimmung der Linienbreite einzelner Signale wegen der Überlagerung benachbarter Signale nicht möglich ist, so kann man doch davon ausgehen, daß die Linienbreite für alle Signale etwa gleich groß ist und nur eine Funktion des jeweiligen pH-Wertes ist. Unter diesen Voraussetzungen ist die Annahme berechtigt, daß für alle Phosphate der gleiche Relaxationsmechanismus und damit die gleiche Rotationskorrelationszeit τ gilt. Damit ist dann ein Vergleich der Signalintensitäten miteinander erlaubt (Cantor und Schimmel, 1980). Die relative Intensität eines Signals (bezogen auf das Gesamtintegral der Signalintensitäten eines Spektrums) kann als Maß für den Anteil der Phosphatgruppe an dem Gesamtphosphatgehalt der Troponinprobe genommen werden. In Korrelation zu den (nach 2.1.6.) bestimmten Phosphatverteilungen für die einzelnen Untereinheiten (s. Tab. 6) lassen sich die nachfolgenden Zuordnungen machen.
Das Serin-1-Phosphat der TnT-Untereinheit kann aus dem Vergleich des TnT-Phospho- und Dephospho-Troponins (3.9.2. und 3.9.3.) in den EGTA- und den Ca^{2+}-Komplexen als das Signal identifiziert werden, das bei pH 7.2 eine chemische Verschiebung von 4.4-4.5 ppm hat. Auf Grund der Überlappung der Signale in den Spektren dieser Troponinkomplexe ist eine exakte Bestimmung der Signalintensität nur bedingt möglich. Für den Phospho-Troponinkomplex (Abb. 23) errechnet sich in relativ guter Übereinstimmung mit dem prozentualen Anteil am Gesamtphosphatgehalt, der nach der Phosphatbestimmungsmethode (s. Kap. 2.1.6.) 32.7 % beträgt (siehe Tab. 6),

ein Intensitätsanteil von 32.8 % (EGTA-Troponin, Abb. 23 A) und 39.1 % für den Ca^{2+}-Troponinkomplex (Abb. 23 E). Im Spektrum des letzteren ist die Überlappung mit anderen Signalen stärker als in demjenigen des erstgenannten Komplexes. Spektrum Abb. 23 D, das einem zu Abb. 23 A äquivalenten Komplex entspricht, kann zur Bestimmung nicht herangezogen werden, da in diesem Spektrum nur das Summenintegral der Signale 2 und 3 ermittelt werden kann.

Für die Mg^{2+}-enthaltenden Troponinkomplexe ist eine Identifizierung des TnT-Signals auf Anhieb nicht möglich. Bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit der ^{31}P-NMR-Signale (Kap. 3.9.5; Abb. 26) hatte sich jedoch gezeigt, daß das intensivere Signal 2 in dem Phospho-TnT-Mg-Komplex oberhalb von pH 7.0 aus zwei Signalen zusammengesetzt ist. Bei pH 6.4 und 6.1 liegen diese Signale getrennt vor. Der Vergleich der relativen Intensitäten der beiden Signale 3 bei 3.39 bzw. 2.89 ppm in den Spektren Abb. 26 E und F (24.2 bzw. 28.2 %) mit dem prozentualen Anteil des TnT-Phosphates am Gesamtphosphatgehalt dieser Troponinprobe (27.0 %; Tab. 6, R 44) ergibt eine gute Übereinstimmung dieser Werte und identifiziert dieses Signal als das des TnT-Phosphates. Bei pH-Werten von 7.0 und höher fällt in den Mg^{2+}-enthaltenden Komplexen die chemische Verschiebung mit der eines TnI-Phosphates zusammen (s. Abb. 24 B,C). Im Unterschied zu der Komplexbildung mit Mg^{2+} wird das TnT-Phosphat durch die Bindung des Ca^{2+} an das Troponin nicht beeinflußt, die chemische Verschiebung des TnT-Signals in den EGTA- bzw. Ca^{2+}-Komplexen scheint identisch zu sein (Abb. 23, A, D, E; Abb. 25, A, B).

Die Identifizierung der weiteren ^{31}P-NMR-Signale, die den Phosphatgruppen in der TnI-Untereinheit zuzuordnen sind, ist nicht ganz so einfach. Eine Schwierigkeit ergibt sich bei der Festlegung des Phosphatgehaltes für die TnI-Untereinheit. In Kap. 3.5.1. war schon darauf hingewiesen worden, daß ein deutlicher Unterschied zwischen dem Phosphatgehalt für den Gesamttroponinkomplex und der Summe der für die Untereinheiten bestimmten Werte besteht (Tab. 6). Die Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung, die Anzahl der ^{31}P-NMR-Signale, die von den TnI-Phosphatgruppen hervorgerufen werden (s. Abb. 24 und 26) sowie die Übereinstimmung der Signalintensitätsver-

teilung (Tab. 12) mit der in Tab. 6 angegebenen prozentualen Verteilung der Untereinheits-Phosphatwerte haben zu der Interpretation geführt, daß in der TnI-Untereinheit zwei phosphattragende Seiten vorliegen. Wie in Kap. 4.2. noch näher begründet werden wird, handelt es sich dabei wahrscheinlich um die Phosphorylierungsseiten Serin-20 und Serin-146 (s. Abb. 1), die durch die cAMP-abhängige Proteinkinase erfaßt werden. Auf Grund des unterschiedlichen chemischen Verhaltens kann der Serin-20-Seite der nach 2.1.6. in der isolierten Untereinheit bestimmte Phosphatwert zugeordnet werden (s. Tab. 5 und 6); die Serin-146-Seite sollte den in Tab. 6 mit Δ bezeichneten Phosphatgehalt haben.
Versucht man unter diesen Voraussetzungen eine Zuordnung der Signale des Dephospho-TnT-Troponins (Kap. 3.9.3.) zu den Serin-20- und Serin-146-Seiten, so ergibt sich für den EGTA-Komplex (Abb. 24 A) eine recht gute Übereinstimmung dann, wenn man dem Serin-20 (63 % des Gesamtphosphatgehaltes) die überlagerten Signale 1 und 2 bei tiefem Feld (4.66 und 4.61 ppm) zuordnet, die 64.4 % der Gesamtintensität ausmachten. Für das Serin-146 ergibt sich dann das Signal 3 bei 4.38 ppm (37 % Phosphatgehalt, 35.6 % Intensitätsanteil). Nach der Zugabe von Mg^{2+} zu dieser Troponinprobe (Abb. 24 B) müssen nun zwei Phosphorylierungsseiten drei getrennte Signale zugeordnet werden. Geht man davon aus, daß durch die Zugabe des Mg^{2+} an dem Besetzungsgrad der einzelnen Phosphatseiten sich nichts ändert, so sollten die jeweiligen Signale ihre relativen Intensitäten beibehalten haben. Dann lassen sich die Signale 2 (4.48 ppm, Abb. 24, B; 4.44 ppm, Abb. 24, C) dem zuerst bei höherem Feld Resonanz zeigenden Serin-146 zuordnen (Signalintensität: Abb. 24, B: 35.7 %, Abb. 24, C: 34,0 %; s. Tab. 12).

Die weitere Aufspaltung der NMR-Signale in diesen Spektren ist nur dann in Übereinstimmung mit der Tatsache zu bringen, daß nur noch eine weitere phosphorylierte Seite (das Serin-20) existiert, wenn man davon ausgeht, daß die Phosphatgruppe in zwei unterschiedlichen chemischen Umgebungen vorliegt, die diese zwei verschiedenen Signale hervorrufen.
Für eine weitere Analyse der Intensitätsverteilung und Signalzuordnung ist der Mg^{2+}-Troponin-Komplex vorteilhaft, bei

dem die pH-Abhängigkeit der ^{31}P-NMR-Signale bestimmt worden ist (Kap. 3.9.5.). Das dabei untersuchte Troponin zeigt eine Verteilung des Gesamtphosphatgehaltes von 27 % TnT, 44 % Serin-20 (TnI) und 29.4 % Serin-146 (TnI). Das Spektrum bei pH 6.1, in dem die Signale am weitesten auseinandergezogen sind, weist eine Intensitätsverteilung von 30.1 % (Signal 1), 41.7 % (Signale 2) und 28.2 % (Signal 3) auf. Eine Zuordnung der Phosphorylierungsseiten zu den einzelnen Signalen in der folgenden Weise scheint gerechtfertigt zu sein: Signal 1: Serin-146, Signal 2: Serin-20, Signal 3: TnT-Phosphat (Serin-1).

Diese Zuordnung gilt auch für höhere pH-Werte, wobei man allerdings durch die Überlagerung des TnT-Phosphatsignals mit dem Serin-20-TnI-Phosphatsignal ab pH 7.3 nur noch ein Summensignal erhält. Das in Abb. 22.2 (A) gezeigte Spektrum ist den Spektren der Abb. 26, die bei einem pH-Wert > 7.0 aufgenommen wurden, sehr ähnlich. Auch der in Abb. 22.2 (A) gezeigte Mg^{2+}-Troponin-Komplex besitzt ein 2-Signal-Spektrum, so daß in Analogie zu den Spektren der Abb. 26 folgende Zuordnung getroffen werden kann: Das intensivere Signal ist das gemeinsame Signal des Serin-1-TnT-Phosphates und des Serin-20-TnI-Phosphates, das kleinere Signal bei niedrigerem Feld entspricht dem Serin-146-TnI-Phosphat.
Während die Troponinproben der Abb. 22.2 (A) und 26 bei dem normalerweise eingestellten pH-Wert der NMR-Messungen von 7.2 ein 2-Signal-Spektrum zeigen, wird für die anderen Proben unter identischen Bedingungen ein 3-Signal-Spektrum beobachtet (Abb. 23 B,C,F; Abb. 24 B,C). Aus dem Vergleich mit den zuerst genannten Spektren ergibt sich, daß das zusätzliche Signal auf der Seite zu niedrigem Feld hinzukommt. Bei der Diskussion der Dephospho-TnT-Troponin-Spektren ist dieses Signal auf Grund der Intensitätsverteilung als ein Teil der Serin-20-Phosphat-Resonanz identifiziert worden.
Dieses Signal zeigt eine relativ geringe Sensitivität auf Veränderungen der Pufferbedingungen durch Zugabe von Metallionen und reagiert auch auf leichte pH-Änderungen der Lösung weniger deutlich als die anderen Signale. Verschiedene Möglichkeiten können als Erklärung für das Auftreten dieses weiteren Signals

diskutiert werden: Die chemische Verschiebung des Signals charakterisiert es als ein Phosphoserinsignal, das wie die anderen Signale durch seine geringe Linienbreite auf eine freie Drehbarkeit hinweist. Eine Fixierung in einer Salzbrücke scheint deshalb für dieses Phosphat nicht zuzutreffen. Daß es sich bei dieser Phosphatseite um eine weitere, dritte Phosphorylierungsseite in der TnI-Untereinheit handelt, ist prinzipiell nicht auszuschließen; die Tatsache allerdings, daß nur max. 2 Phosphorylierungsbanden in der isoelektrischen Fokussierung zu beobachten sind und der max. bestimmte Phosphatgehalt für die TnI-Untereinheit auch nur für 2 anstelle von 3 Phosphorylierungsseiten spricht, steht dieser Möglichkeit entgegen. Denkbar wäre weiterhin, daß eine Phosphorylierungsseite A durch den Phosphateinbau an einer anderen Seite B so in ihrer chemischen Umgebung beeinflußt wurde, daß für den Diphospho-TnI-Komplex die Phosphorylierungsseite A ein anderes Signal ergibt als im Monophospho-TnI-Komplex. Die drei Signale für die TnI-Untereinheit würden sich dann aus einem Gemisch des Mono- und Diphospho-TnI-Troponins in der Probe ergeben. Für eine Probe, in der die TnI-Untereinheit vollständig an zwei Seiten phosphoryliert ist, sollte allerdings diese Signalaufteilung in 3 Signale nicht zu beobachten sein. Dies ist aber für die Probe Abb. 22.2 (A) der Fall. Andererseits konnte für die Troponinprobe bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit (Abb. 26), obwohl keine vollständige Phosphorylierung der TnI-Untereinheit vorlag, nur 2 TnI-Signale beobachtet werden. Diese Erklärungsmöglichkeit scheint deshalb nicht zuzutreffen.

Die Beobachtung eines getrennten Signals bedeutet letztlich, daß das Phosphat dieser Seite sich in einer anderen chemischen Umgebung befindet als die übrigen Phosphatgruppen. Die Beobachtung, daß für den metallionenfreien Komplex die chemische Umgebung für die Phosphoserinsignale 1 und 2 in Abb. 23, A und 24, A offenbar sehr ähnlich, wenn nicht identisch ist und sich erst auf die Zugabe der zweiwertigen Metallionen ändert, könnte in folgender Weise interpretiert werden: Die Bindung von Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} an den Troponinkomplex via TnC-Untereinheit bewirkt eine Konformationsveränderung (zumindest an der TnC-Untereinheit)

(Kap. 1.), die sich in einer veränderten chemischen Umgebung für die einzelne Phosphatgruppe bemerkbar machen kann. Wird nun ein Teil der TnI-Untereinheit in einer bestimmten Konformation festgehalten und damit die chemische Umgebung für diesen Teil nicht verändert, so ist es vorstellbar, daß nur der andere Teil mit seiner Phosphorylierungsseite die Metallionenbindung und die damit verbundene konformative Veränderung erfährt. Die Verschiebung des ^{31}P-NMR-Signals würde diese Veränderung anzeigen. Die Existenz zweier getrennter, schmaler Signale für diese Phosphorylierungsseite würde voraussetzen, daß die konformationelle Veränderung zu zwei starren, nicht schnell austauschenden Zuständen führt, da sonst mit einer Verbreiterung der involvierten ^{31}P-NMR-Signale zu rechnen wäre. Eine solche starre Konformation könnte durch eine S-S-Disulfidbrücke oder durch eine H^+-Brückenbindung erzielt werden, in die allerdings die Phosphatgruppe nicht mit einbezogen wäre. Es ist nicht auszuschließen, daß die Reduktionsmittelkonzentration in einigen NMR-Proben nicht ausreichte, die TnI-Untereinheit, deren leicht Oxidierbarkeit bekannt ist (Hincke et al., 1979), in ihrer reduzierten Form zu halten.

Zusammenfassend lassen sich die Veränderungen der NMR-Spektren auf die Zugabe von Mg^{2+} so beschreiben: Ausgangspunkt ist ein metallionenfreier Zustand des Komplexes, in dem das Phosphat der Serin-146-Seite den vergleichsweise stärksten Protonierungsgrad aufweist. Das TnT-Phosphat und das Serin-20-TnI-Phosphat zeigen im Vergleich zum Serin-146-TnI-Phosphat bei niedrigerer Feldstärke Resonanz. Die Zugabe von Mg^{2+}-Ionen bei einem pH-Wert von > 7.0 zu einer solchen Troponinprobe bewirkt, daß sowohl die Resonanzfrequenz des TnT-Serin-1-Phosphates wie auch die des Serin-20-Phosphates zu einer apparent gemeinsamen Resonanzfrequenz zu höherem Feld verschoben werden. Diese Resonanzfrequenz entspricht in etwa der des Serin-146-Phosphates im metallionenfreien Zustand. Die Resonanzfrequenz des TnI-Serin-146-Phosphates wiederum wird im Mg^{2+}-Troponin zu tieferer Feldstärke verschoben ($\Delta\delta = f(Mg^{2+})$: TnT-Serin-1-Phosphat: - 0.13 ppm; TnI-Serin-20-Phosphat: -0.20 ppm; TnI-Serin-146-Phosphat: + 0.14 ppm).

Für den Übergang vom Mg^{2+}- zum Mg^{2+}-Ca^{2+}-Troponinkomplex sind signifikante Veränderungen auf die Zugabe von Ca^{2+} hin nicht zu beobachten oder nachzuweisen. Eine verläßliche Analyse der Signalintensitäten des Ca^{2+}-bindenden Komplexes ist nur von den 101.257 MHz-Spektren (Abb. 25) zu erwarten, da die ^{31}P-NMR-Signale dieses Komplexes bei Aufnahmen mit dem 72.86 MHz-Gerät eine starke Überlappung zeigen. Die Verteilung des proteingebundenen Phosphates auf die Untereinheiten und die Verteilung der NMR-Signal-Intensitäten dieser Probe sind in den Tabellen 6 und 12 angegeben. Eine Zuordnung der Signale zu einzelnen Phosphatgruppen läßt sich für den metallionenfreien Komplex wie folgt vornehmen: Signal 1: Serin-1-TnT-Phosphat; Signal 2: TnI-Serin-20-Phosphat; Signal 3: TnI-Serin-146-Phosphat. Die Zugabe von Ca^{2+}-Ionen bewirkt eine Veränderung des Spektrums, die einmal durch die Aufspaltung der Serin-20-Resonanz zu einem 4-Signal-Spektrum führt, weiterhin aber auch eine Verschiebung der TnI-Phosphatsignale in der oben beschriebenen Weise aufzeigt. Während die Serin-146-Phosphatresonanz zu tieferer Feldstärke verschoben wird, erscheint die des Serin-20-Phosphates bei höherem Feld (abgesehen von dem durch die Aufspaltung der Resonanz verursachten Signal an der linken Seite des Phosphoserin-Resonanzbereiches). Im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Zugabe von Mg^{2+}-Ionen zeigt das TnT-Phosphatsignal (Signal 3, Abb. 25, B) eine von der des Serin-20-Phosphates verschiedene Resonanz. Eine gleichartige Verteilung der Resonanzsignale kann auch für den Ca^{2+}-Troponinkomplex in Abb. 23, E angenommen werden. Die Erhöhung auf 10 mM $CaCl_2$ (Abb. 25, C) verändert die relative Lage der drei Signale 2,3 und 4 zueinander nicht.
Die Verschiebung des TnT-Serin-1-Phosphatsignals nach Mg^{2+}-Zugabe könnte somit kein unspezifischer Effekt in Folge der Metallionenkonzentration gewesen sein, sondern auf einer spezifischen Wechselwirkung beruhen.

4. Diskussion

4.1. Vergleich mit bislang veröffentlichten Präparationsverfahren im Hinblick auf die Inaktivierung hydrolytischer Enzymaktivitäten und den Erhalt des proteingebundenen Phosphates

Schon Tsukui und Ebashi hatten in ihrer 1973 veröffentlichten Mitteilung, in der sie ein Präparationsverfahren für Herzmuskel-Troponin beschrieben, auf den erhöhten Fremdproteinanteil hingewiesen, den das (Roh)Troponin im Vergleich zu dem Skelettmuskel-Troponin beim gleichen Präparationsschritt zeigte; eine weitere Reinigung des Herzmuskel-Troponins war nur durch die Kombination verschiedener Chromatographie- und Gelfiltrationsschritte zu erzielen, wobei man einen Verlust an Troponin in Kauf nahm.
Die Arbeit von Tsukui/Ebashi stand am Beginn einer Reihe weiterer Publikationen anderer Arbeitsgruppen, die sich zum gleichen Thema äußern (Brekke und Greaser, 1976; Stull und Buss, 1977; Lin und Cassim, 1978; Burtnick, 1977; Byers et al., 1979; Holroyde et al., 1980; Potter, 1982). Gleichgültig, ob es sich bei diesen Arbeiten um die Darstellung eines völlig neuen Präparationsweges handelte oder um die Modifizierung eines bestehenden Verfahrens, die Vielzahl der Arbeiten macht deutlich, daß die Darstellung eines sauberen Troponins nicht ohne weiteres zu erzielen ist und für dieses Ziel mehrere Möglichkeiten offen stehen. Hauptsächlich die Entfernung der Fremdproteine Myosin und Actin hatte zu der Entwicklung der unterschiedlichen Strategien geführt.
Alternativ zu der von Tsukui und Ebashi angewendeten 0.4 M LiCl-Extraktion wurde in anderen Präparationsverfahren (Brekke und Greaser, 1976; Stull und Buss, 1977) eine Solubilisierung der myofibrillären Proteine in einem 1 M KCl-Puffer erzielt. In dem von Stull und Buss vorgeschlagenen Präparationsweg war dieser Extratkion die Bildung von Muskeltrockenfasern durch Ethanolpräzipitation und Ethertrocknung vorgeschaltet, die später auch von Potter (1982) beibehalten wird. In beiden

Verfahren erfolgte eine abschließende Reinigung des Troponinkomplexes und die Abtrennung vom Tropomyosin durch eine Chromatographie über Hydroxylapatit.
Bei einer Entscheidung zwischen diesen 3 Präparationsverfahren, die zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannt waren, war als maßgebliches Kriterium die Präparationsdauer gewählt worden. Wie im Falle des Skelettmuskel-Troponins (Sperling et al., 1979) war auch für das Herzmuskel-Troponin bekannt, daß es leicht durch Proteasen degradiert wurde (Toyo-aka und Masaki, 1979). Da für beide Muskeltypen proteolytische Aktivität nachgewiesen war (Waxman und Krebs, 1978), mußte es Ziel eines Präparationsverfahrens sein, das Troponin in möglichst kurzer Zeit zu extrahieren und von den Proteasen abzutrennen. Unter diesem Aspekt zeigt das Verfahren von Tsukui und Ebashi deutliche Vorteile gegenüber den anderen Methoden: während bei diesen Extraktionsdauern von 16-20 Std. bzw., nach der Darstellung der Trockenfasern, von mindestens 12 Std. angesetzt sind, erfolgt die LiCl-Extraktion innerhalb von 2-3 Std. und eine Anreicherung des Troponins als Rohtroponin gelingt innerhalb von max. 6 Std..

Eine Stabilisierung gegenüber proteolytischer Degradation während der Präparation wird durch folgende Faktoren erzielt: durch die Protease-Inhibitoren PMSF und Benzamidin in den Extraktionslösungen, durch die Vermeidung längerer Dialysezeiten hochkonzentrierter Proteinlösungen im Zuge der Reinigung, durch die Herabsetzung der freien Ca^{2+}-Ionen-Konzentration in den Extraktionspuffern und durch die Vermeidung von Protease-Aktivierung durch SH-Reagenzien während der Präparation. Weitere chromatographische Reinigungsschritte führen dann zu dem gewünschten stabilen Troponin.
Die Verdünnungspräzipitation des Myosins vor dem Auftragen auf die DEAE-Cellulose-Säule, verbunden mit der dadurch erreichten Reinigung des Troponins, die nahezu ausschließliche Adsorption des Troponins und die Abtrennung des Aktins durch diese Chromatographie kennzeichnen diesen Schritt in dem in dieser Arbeit vorgestellten Präparationsverfahren als eine wesentliche Verbesserung der Troponindarstellung im Vergleich zu

den zitierten Arbeiten. Die von Byers et al. (1979) angegebenen Modifikationen des Tsukui/Ebashi-Präparationsverfahrens entsprechen bis auf die Verdünnungspräzipitation des Myosins den hier dargestellten Veränderungen; durch die Dialyse der Rohtroponin-Lösung nehmen diese Autoren allerdings eine erhöhte Degradierung und Dephosphorylierung des Troponins in Kauf (s.u.).
Die proteolytische Aktivität im Herzmuskelhomogenat erwies sich auch bei später publizierten, modifizierten Präparationsformen (Holroyde et al., 1980; Potter, 1982) als die hauptsächliche Störquelle. Aus diesem Grunde wurde es von den genannten Autoren vorgezogen, in Harnstoff denaturierte Untereinheiten zu präparieren und aus diesen den Troponin-Komplex zu rekonstituieren. Während einerseits durch diesen Schritt die notwendigen Reinigungsverfahren nur auf die Untereinheiten hin verschoben wurden, nahm man sich (zum Teil, zumindest) die Möglichkeit, den Troponinkomplex in einer ursprünglichen und unmodifizierten Form zu untersuchen.
Aus dem gleichen Grund galt dies auch für den Ethanol/Ether-Schritt bei dem von Stull/Buss bzw. Potter angegebenen Verfahren (s.o.). Betrachtet man die Präparation auch unter dem Aspekt, das Troponin möglichst in seiner phosphorylierten Form zu erhalten, so empfiehlt es sich, die Ethanol-Fällung der myofibrillären Proteine auszulassen. Aus dem (Rinder-) Herzmuskel läßt sich eine Phosphoprotein-Phosphatase isolieren (Lee, 1981), die aus ihrer hochmolekularen, Mn^{2+}-abhängigen Form durch eine Ethanol-Fällung irreversibel fragmentiert wird, und dabei eine ca. 35000 D große, katalytische Untereinheit freisetzt. Nach der Wiederaufnahme der Muskeltrockenfasern in 1 M KCl-Puffer des Stull/Buss-Verfahrens konnte deshalb eine Dephosphorylierung der TnI-Untereinheit erfolgen (s. Kap. 3.5.2.1.1.). Der relativ niedrige endogene Phosphatgehalt, der für das Troponin der Stull/Buss-Präparation nachgewiesen wurde (TnT: 0.18 Mol P; TnI: 0.29 Mol P), ist neben den sehr drastischen Bedingungen des Phosphatnachweistests vermutlich auf die Aktivierung der Phosphatase zurückzuführen. Aus den gleichen Gründen konnten deshalb auch

Berson et al. (1978) keinen höheren endogenen Phosphatgehalt für die TnI-Untereinheit bestimmen. Eine Harnstoffdenaturierung, wie sie von Holroyde et al. (1980) und Potter (1982) für die Gewinnung der isolierten Untereinheiten eingesetzt wurde, ist für ein phosphatasekontaminiertes Troponin nicht empfehlenswert, wenn man den proteingebundenen Phosphatgehalt einer Untereinheit bestimmen will. Durch eine nur teilweise Inhibierung der Phosphatase im Harnstoffmedium ist es durchaus möglich, aufgefaltete Phosphopeptide (auch unspezifisch) zu dephosphorylieren und so den Phosphatgehalt in vitro herabzusetzen. Eine beachtliche, endogene Restphosphatase-Aktivität wurde von Westwood und Perry (1981) selbst in 8 M Harnstoff-Homogenaten von Kaninchen-Herzmuskel beobachtet, durch die innerhalb von 4.5 Std. bei 0 ^{o}C 50 % der phosphorylierten P-Leichten Kette des Myosins dephosphoryliert wurden.

Eine Angabe über den proteingebundenen Phosphatgehalt der Troponin-Komplexe, die nach dem Verfahren Brekke/Greaser oder Byer et al. präpariert wurden, liegt nicht vor. Auf Grund der angegebenen Präparationsbedingungen ist nur mit einem geringen proteingebundenem Phosphatgehalt zu rechnen, bedingt hauptsächlich durch lange Dialyse- und Extraktionszeiten sowie keiner vollständigen Abtrennung der Mn^{2+}-stimulierten Phosphatase, die nach den Ergebnissen dieser Arbeit zusammen mit dem Troponin zwischen 30-45 % Ammoniumsulfat-Sättigung ausgefällt wird.

Um eine Dephosphorylierung des Troponins während des Präparationsverlaufes zu verhindern, war durch die Zugabe von Fluorid und EDTA eine Inhibierung der vorhandenen Phosphatase-Aktivitäten beabsichtigt worden; die Zunahmen des endogenen Phosphatgehaltes des Troponins, die im Laufe der Präparationsentwicklung zu beobachten war, zeigt, daß diese Veränderungen erfolgreich gewesen waren. Den Fluorid-Ionen kam dabei neben der Inhibierung der sauren Phosphatase-Aktivität sicherlich auch eine Funktion als Komplexor für Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen zu, so daß bei einer Konzentration von 50 mM KF und 5 mM EDTA in der Guba-Straub-Extraktionslösung und 25 mM KF und 1 mM EDTA

in den anderen Extraktions- und Waschungslösungen die Konzentration der freien Metallionen in den mikro- bzw. nanomolaren Bereich herabgesetzt wurden. Neben der Phosphatase-Inaktivierung wurden damit aber auch andere metallionen-abhängige Reaktionen beeinflußt; die im Herzmuskel vertretene, Ca^{2+}-abhängige Protease-Aktivität dürfte ebenso gehemmt worden sein (was den geringen Anteil proteolytisch angestauten Troponinmaterials erklären würde), wie mit Sicherheit auch die Mg^{2+}- und/oder Ca^{2+}-abhängige Proteinkinase-Aktivitäten, so daß eine in vitro-Phosphorylierung des Troponins während der Präparation unwahrscheinlich ist.
Unter Einhaltung der in Kap. 3.1. dargestellten Bedingungen war es möglich, einen hinsichtlich proteolytischer Aktivität und Dephosphorylierung stabilen Troponin-Komplex zu präparieren, wie Inkubationstests (3.5.2.1.1.) und die NMR-Messungen (3.9.) zeigten.

4.2. Proteingebundener Phosphatgehalt und Phosphorylierungsverhalten des Herzmuskel-Troponins

Der proteingebundene Phosphatgehalt des Troponinkomplexes, der nach dem in Kap. 2.1.1. angegebenen Verfahren präpariert worden war, liegt wesentlich höher als der bis dahin allgemein angenommene oder angegebene Wert (Stull, 1980).
Der durchschnittliche, nach 2.1.6. bestimmte proteingebundene Phosphatgehalt beträgt 2.26 Mol P/77500 g Protein, bei einer Verteilung des Phosphates von 0.7 Mol P/TnT- und 0.91 Mol P/TnI-Untereinheit. Nur Moir et al. (1980) hatten vergleichbare Werte für den Phosphatgehalt der TnI-Untereinheit bestimmt.
Zur Bestimmung der Verteilung des Phosphates auf verschiedene Phosphorylierungsseiten in den Untereinheiten dient neben der naßchemischen Bestimmungsmethode nach Bartlett (2.1.6.) auch die isoelektrische Fokussierung (Kap. 3.5.3.) und die Aufspaltung und Intensitätsverteilung der ^{31}P-NMR-Signale (Kap. 3.9., Tab. 12).
Die Ergebnisse der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden sprechen dafür, daß in der TnT-Untereinheit eine fast vollständig besetzte Phosphorylierungsseite vorliegt: der Wert von 0.8 Mol P, der maximal für die isolierte Untereinheit bestimmt wird bzw. für eine Gesamttroponinprobe, in der die TnI-Untereinheit vollständig dephosphoryliert wurde (s. Tab. 6), spricht für nur eine Phosphorylierungsseite. Der Wert stimmt mit den Ergebnissen von Gusev et al. (1983) überein, die für einen Teil ihrer TnT-Präparation den gleichen endogenen Phosphatgehalt bestimmten. Auch das Verschwinden nur eines ^{31}P-NMR-Signals für eine Troponinprobe, in der durch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm die TnT-Untereinheit dephosphoryliert wurde (Kap. 3.9.3.), läßt sich mit der Existenz nur einer Phosphatseite in der TnT-Untereinheit erklären. Die Multiplizität der IEF-Banden der TnT-Untereinheit (Kap. 3.5.3., Abb. 11) steht dieser Interpretation nicht entgegen, wenn man berücksichtigt, daß die TnT-Untereinheit in zwei Isoformen vorkommen kann (Dhoot et al., 1979; Gusev et al., 1983). Die Sequenz der Phosphorylierungsseite wurde in dieser Arbeit

nicht bestimmt, doch kann auf Grund der Ergebnisse von Moir und Perry (1982) und Gusev et al. angenommen werden, daß das Serin-1 auch in der TnT-Untereinheit des Herzmuskel-Troponins die Phosphorylierungsseite darstellt. Der sehr viel niedrigere Phosphatgehalt, mit dem die TnT-Untereinheit bislang präpariert wurde, ist auf die hohe Konzentration der sauren Phosphatase-Aktivität im Herzmuskel (Kap. 3.1., Kap. 3.5.2.1.1., und Kap. 4.3.) zurückzuführen.
Die TnI-Untereinheit sollte auf Grund der IEF-Banden (Abb. 6) und der ^{31}P-NMR- Signale (Kap. 3.9.) mehrere, zumindest zwei phosphorylierte Seiten nach der Präparation zeigen. Auch der direkt bestimmte endogene Phosphatgehalt der Gesamttroponinproben (Tab. 5 und 6) deutet auf eine Phosphorylierung an mehr als einer Seite hin, wohingegen für die isolierte TnI-Untereinheit der nach 2.1.6. bestimmte Phosphatgehalt kaum über einen Wert von 1.0 Mol P/TnI-Untereinheit hinausgeht.
Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigen alle mit der isoelektrischen Fokussierung untersuchten Troponinproben (bis auf R 49_B, Gel 4, Abb. 11) eine Bande für eine zweifach phosphorylierte TnI-Untereinheit; dies gilt auch für die aus diesen Komplexen isolierten Untereinheiten. Besonders ausgeprägt ist dies für die Proben R 45.1, 45.2 und 49_A. Der Differenzwert Δ (Tab. 6) ist für diese Proben am höchsten.
Die geschilderte Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der einzelnen Untersuchungen läßt sich dann erklären, wenn man annimmt, daß im Verlauf der Bestimmung des proteingebundenen Phosphates dieses teilweise in der isolierten TnI-Untereinheit hydolysiert und bei der Bestimmung nicht berücksichtigt wird. Daß dies durchaus der Fall sein könnte, berichten Moir et al. (1980). Sie stellten für die TnI-Untereinheit, die sie aus perfundierten Kaninchenherzen präparierten, eine Erhöhung des proteingebundenen Phosphates nach Adrenalinstimulation von 1.14 auf 1.86 Mol P fest. Versuchten sie allerdings, nach CNBr-Fragmentierung die Phosphorylierungsseiten zu identifizieren, so konnten sie kovalent gebundenes Phosphat nur in der Serin-20-Seite nachweisen. Die Besetzung der Serin-20-Seite erhöhte sich von 30-40 % auf 100 % in der An-

wesenheit von Adrenalin. Den völligen Verlust des weiteren, proteingebundenen Phosphates erklären sie damit, daß dieses Phosphat in einer säurelabilen Phosphorylierungsseite lokalisiert sei. Da der Phosphatnachweis nach Bartlett (Kap. 2.1.6.) acide Fällungs- und Lösungsschritte enthält, ist eine solche Esterhydrolyse, wie von Moir et al. beschrieben, auch für die TnI-Untereinheit in dieser Arbeit möglich. Die Voraussetzung ist allerdings, daß die Hydrolyse an der einen TnI-Seite nur für die isolierte TnI-Untereinheit zu beobachten ist. Der Einfluß der Denaturierung durch eine 8 M Harnstofflösung muß berücksichtigt werden, da die Untereinheiten in der Regel direkt aus den Harnstofflösungen nach der Untereinheitsauftrennung für den Nachweis des proteingebundenen Phosphates eingesetzt wurden. Im Holo-Troponin erfolgt diese Hydrolyse durch die Komplexierung mit den anderen Untereinheiten nicht. Unter diesen Voraussetzungen entspricht der für die isolierte TnI-Untereinheit nachgewiesene Phosphatgehalt nur dem Gehalt der Serin-20-Seite. Der Differenzwert Δ (Tab. 6) gibt den Betrag für die weitere phosphattragende Seite der TnI-Untereinheit. Diese Seite ist durch Phosphorylierung mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase vollständig aufzufüllen (s. Proben R 45.1 und 45.2, Tab. 6 und Abb. 11). Als zweite, durch diese Kinase phosphorylierbare Seite ist das Serin-146 der TnI-Untereinheit des Herzmuskel-Troponins bekannt, die auch durch die Anwesenheit der TnC-Untereinheit nicht blockiert wird (Moir und Perry, 1977). Die weitere phosphattragende Seite der TnI-Untereinheit könnte deshalb Serin-146 sein.

Der durchschnittliche TnI-Gesamtphosphatgehalt nach der Präparation ist deshalb 1.37 Mol P/Mol TnI.

Der nach 2.1.1. präparierte Troponinkomplex zeigt ein Phosphorylierungsverhalten, daß mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen gut übereinstimmt. Durch die cAMP-abhängige Proteinkinase werden die beiden Seiten Ser-20 und Ser-146 der Herzmuskel-TnI-Untereinheit erreicht. In dieser Arbeit wird, in Abhängigkeit von dem vorliegenden Besetzungszustand der TnI-Phosphorylierungsseiten, eine weitere Phosphorylierung bis maximal zur vollständigen Besetzung dieser zwei Seiten beobachtet (s. Tab. 9). Der maximale Phosphateinbau ist nur unter

den präparativen Testbedingungen (nach 2.1.8.1.(b)) zu beobachten gewesen, die Einbauwerte für den analytischen Testansatz sind deutlich niedriger. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse kann in den verschiedenen Aufarbeitungs- und Nachweismethoden zu sehen sein: Möglicherweise erfolgt durch den TCA-Fällungs- und Waschungsschritt in dem analytischen Ansatz (2.1.8.1.(a)) eine Hydrolyse der säurelabilen Serin-146-Seite, so daß mit diesem Ansatz nur die Phosphorylierung der Serin-20-Seite bestimmt wird. Im präparativen Ansatz, in dem ein Säurefällungsschritt unterbleibt, könnte dagegen die Phosphorylierung an beiden Seiten beobachtet worden sein.

Die Labilität der einen Phosphoserinseite (Ser-146) hat bislang wahrscheinlich verhindert, daß sie bei der Bewertung des Phosphorylierungsverhaltens berücksichtigt wurde. Auf Grund der geringen Geschwindigkeit, mit der die Ser-146-Seite phosphoryliert wurde (Moir et al., 1977) und der Tatsache, daß sie anscheinend nicht mit dem intrazellulären ATP/Phosphat-Pool äquilibriert werden konnte, wie Experimente mit $^{32}P_i$ zeigten (Moir et al., 1980), war ihr bislang keine weitere Beachtung geschenkt worden. Durch die ^{31}P-NMR-Spektroskopie ist es nun möglich gewesen, diese zweite Phosphorylierungsseite in der TnI-Untereinheit auch in ihrer Wechselwirkung mit anderen Untereinheiten sichtbar zu machen.

Phosphorylase-Kinase vermag insgesamt 4 Seiten zu phosphorylieren, wenn die isolierte TnI-Untereinheit als Substrat vorliegt (Moir und Perry, 1980). Im TnI-TnC-Komplex oder im Holotroponin sind dagegen die Hauptphosphorylierungsseiten Ser-72 und Ser-138 der Phosphorylierungsreaktion nicht zugänglich, auf Grund der sterischen Blockade durch die TnC-Untereinheit. Die Phosphorylierung der Ser-20-Seite, die auch teilweise durch die Phosphorylase-Kinase erreicht wird, ist durch die Komplexierung mit der TnC-Untereinheit nicht blockiert. Die Phosphorylierung an dieser Seite kann deshalb den (geringen) Phosphateinbau ins Troponin bei Inkubation mit der Phosphorylase-b-Kinase erklären (Kap. 3.5.2.4.).

4.3. Zuordnung der endogenen Phosphatase-Aktivitäten

Die Tatsache, daß es möglich ist, einen wesentlich höher phosphorylierten Herzmuskel-Troponin-Komplex zu präparieren, wenn entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, zeigt, daß der bis dahin sehr viel niedriger angegebene Phosphatgehalt des Herzmuskel-Troponins (Stull, 1980) auf endogene, kontaminierende Phosphatase-Aktivität während der Präparation zurückzuführen ist. An Hand der Inkubationstests (2.2.1. und 2.1.4.) lassen sich zwei Phosphatase-Aktivitäten in den Extraktionslösungen bei dieser Präparation nachweisen, eine im sauren pH-Bereich und eine im neutralen bis alkalischen pH-Bereich. Eine Kreuzinkubation zeigte, daß die im alkalischen pH-Bereich aktive Phosphatase sich durch Mn^{2+}, aber nur wenig durch Zn^{2+} (Aktivator für alk. Phosphatase aus Kälberdarm) reaktivieren läßt (Kap. 3.5.2.1.). Auch das unterschiedliche Verhalten während des Reinigungsverfahrens spricht dafür, daß es sich um zwei unterschiedliche Phosphatasen handelt: Die saure Phosphatase kann mit der 0.1 m KCl-Stufe der DEAE-Cellulose-Säule entfernt werden, während die alkalische Phosphatase zusammen mit dem Troponin an der Säule gebunden bleibt und erst bei höherer KCl-Konzentration eluiert wird (s. Kap. 2.1.4.). Darüberhinaus liegt auch eine unterschiedliche Substratspezifität vor: Mit dem Substrat Phosphotroponin wird durch die saure Phosphatase das TnT-Phosphat hydrolysiert, die TnI-Untereinheit wird durch die alkalische Phosphatase-Aktivität dephosphoryliert. An Hand von Literaturangaben soll eine Zuordnung zu bekannten Phosphatasen vorgenommen werden.
Bei der sauren Phosphatase-Aktivität handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um die auch im Blutserum nachweisbare Aktivität, die für viele Organe und besonders für die Erythrocyten bekannt ist. Durch das Präparationsverfahren wird diese Aktivität freigesetzt; die hohe Phosphatase-Aktivität ergibt sich daher, daß der Herzmuskel als ein sehr stark durchblutetes Organ Erythrocyten in einer hohen Konzentra-

tion aufweist. Bei Nicht-Inhibierung dieser Phosphatase (ohne Fluorid) ist sie offensichtlich in der Lage, die TnI-Untereinheit zu dephosphorylieren.
Mit der Entdeckung der regulatorischen Funktion der Phosphorylierung (bzw. Dephosphorylierung) von Proteinen verstärkte sich die Suche nach Phosphoprotein-Phosphatasen, die im kontrollierten Zusammenspiel mit entsprechenden Kinasen die 'Stellglieder' in einem solchen Regelkreis darstellen. Eine Vielzahl detaillierter Einzelergebnisse wurde dazu in den letzten Jahren veröffentlicht, umfangreiche Zusammenfassungen der wichtigsten Ergebnisse erfolgte in zwei kürzlich erschienenen Artikeln (Lee et al., 1980; Li, 1982).

An Hand der dort aufgeführten Charakteristika liegt die Annahme nahe, daß es sich bei der zweiten Phosphatase-Aktivität um eine Typ I-Phosphatase (Nomenklatur s. Li, 1982) handelt. Als Ergebnis der Inkubationstests kann gesagt werden, daß diese Mn^{2+}-stimulierbare Phosphatase-Aktivität (in vitro) eine Spezifität für die Dephosphorylierung der TnI-Untereinheit besitzt (3.5.2.1.1.). Dabei werden beide endogenen phosphattragenden Seiten erfaßt. Chou et al. (1977), Killilea et al. (1978) und Li et al. (1979) sprechen dieser Phosphatase eine hohe Spezifität für Phosphorylierungsseiten zu, die durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert wurden. Auch die Phosphatseiten, die in der TnI-Untereinheit des Troponin-Komplexes endogen Phosphat enthalten, fallen unter diese Kategorie (3.5.2.
Da während der Präparation keine drastischen Reinigungsschritte (wie etwa 70 %ige Ethanol-Fällung, ME-Aktivierung oder Ca^{2+}-Aktivierung von Proteasen) vorkommen, kann man davon ausgehen, daß die hochmolekulare Form der Phosphatase vorliegt (2.1.4.). Die Gelfiltrationsdaten bei der Abtrennung der Phosphatase vom Troponin-Komplex (Gelfiltration über die Sephacryl-S 300 Säule; Abb. 3) sprechen für einen großen apparenten Stokesschen Radius, wie er für einige vergleichbare Phosphoprotein-Phosphatasen gefunden wird (Lee, 1980; Li 1982).

4.4. Stöchiometrische Zusammensetzung des Herzmuskel-Troponins

Ein Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, die Frage der Stöchiometrie des Troponinkomplexes zu klären. Nachdem Sperling et al. (1979) für den von ihnen präparierten Skelettmuskel-Troponinkomplex eine 1:2:1-Stöchiometrie (T:I:C) angegeben haben, wobei sie die Veränderung im Vergleich zu der bis dahin allgemein akzeptierten 1:1:1-Stöchiometrie (Potter, 1974; Ebashi et al., 1971) auf eine Abtrennung kontaminierender proteolytischer Aktivität zurückführten, wurde die Diskussion um die Zusammensetzung des Troponin-Komplexes erneut aufgegriffen. Bei der Entwicklung des Präparationsverfahrens für den Herzmuskel-Troponinkomplex ist neben der Phosphatase-Inaktivierung besonders auf die Inhibierung und Abtrennung der Proteasen geachtet worden (s. 4.1.).
Die Entwicklung des Präparationsverfahrens läßt sich in zwei Abschnitte trennen. Mit den ersten Präparationen, bei denen eine Reinigung des Troponins hauptsächlich durch Dialyseschritte bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und zwei aufeinanderfolgende Gelfiltrationsschritte erreicht wird, wird ein Troponinkomplex isoliert, der eine an TnC-verarmte Zusammensetzung aufweist (s. Tab. 10).
Die Kombination der DEAE-Austauscherchromatographie, durch die besser Fremdproteine und degradierte Untereinheiten bzw. Troponinkomplexe abgetrennt werden können, mit einer anschließenden Gelfiltration erlaubt, einen Troponin-Komplex zu präparieren, der einer 1:1:1 Stöchiometrie entspricht (Tab. 10). Nicht nur die Ergebnisse an Hand der Anfärbung der Untereinheitsbanden und die Bestimmung der Färbungsintensitäten sprechen für eine solche Stöchiometrie. Auch die Bestimmung der TnI-Gesamtmenge aus verschiedenen Troponinproben nach der Auftrennung in die Untereinheiten (Tab. 3) gibt keinen Hinweis auf einen höheren Gehalt an dieser Untereinheit im Troponin. Die Analyse der hydrodynamischen Daten und die Bestimmung des proteingebundenen Phosphatgehaltes (Tab. 5 und 6; Kap. 3.5.3.) ergeben nur mit einem Molekulargewicht von 77500 D eine übereinstimmende Interpretation der Meßwerte (s.a. Kap. 3.7.).

Mit einem sehr ähnlichen Präparationsverfahren hatten Byers et al. (1979) aus dem Rinderherzmuskel einen Komplex gleicher Zusammensetzung präpariert. Ihr Versuch schlug fehl, einen TI_2C Komplex durch Zugabe von überschüssigem TnI zu rekonstituieren; durch Gelfiltrationsverfahren war das überschüssige TnI abzutrennen (Byers und Kay, 1982). Im Gegensatz zu den von ihnen durchgeführten Experimenten und Feststellungen ist es aber mit dem in dieser Arbeit präparierten Troponinkomplex möglich, allein durch Gelfiltration das Troponin unter nicht denaturierenden Bedingungen zu dissozieren (s. Kap. 3.7.4.; Gelfiltration unter EGTA-Bedingungen). Da offensichtlich der einzige Unterschied zwischen den beiden Troponinkomplexen ihrer Arbeit und der vorliegenden Arbeit in dem Phosphatgehalt des Troponins zu sehen ist, muß dieses Verhalten auf eine Veränderung der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des Troponins durch die proteingebundenen Phosphatgruppen zurückzuführen sein. Daß die TnC-Untereinheit aus dem Komplex mit den anderen Untereinheiten herauszulösen ist, war nach jüngsten Veröffentlichungen durch eine EGTA-EDTA-Extraktion von Myofibrillen gezeigt worden (Zot und Potter, 1982; Moss et al., 1983). Die Integrität des zu präparierenden Troponinkomplexes ist daher nicht unbedingt gegeben und Variationen in der stöchiometrischen Zusammensetzung des Troponinkomplexes sind durchaus als Präparationsartefakte anzusehen. Yates und Greaser(1983) konnten eine äquimolare Stöchiometrie des Skelettmuskel-Troponins in Myofibrillen (durch Auftrennung auf SDS-Gelen und Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung) bestimmen. Die Variation in der stöchiometrischen Zusammensetzung des von ihnen parallel präparierten, isolierten Troponinkomplexes war bedeutend größer und deutete auf eine präparationsbedingte Veränderung des Komplexes hin. Für die (minimale) Stöchiometrie des Troponinkomplexes kann man deshalb von einer 1:1:1-Zusammensetzung ausgehen.

4.5. Hydrodynamische Eigenschaften des Phosphotroponins

Nach den Ergebnissen der hydrodynamischen Untersuchungen (Kap. 3.7.) stellt sich das in dieser Arbeit untersuchte Phosphotroponin als ein asymmetrisches, langgestrecktes Molekül dar. Ein Reibungskoeffizient f/f_m von 1.88 (für den EGTA- bzw. den Ca^{2+}-Troponin-Komplex) spricht bei einem part. spezifischen Volumen von 0.73 mL/g und einem Hydratationswert von 0.44 g H_2O/g, für ein Achsenverhältnis eines äquivalenten Ellipsoidmodells von 11:1 (Tab. 11). Die aus den anderen hydrodynamischen Formfaktoren ß und ν_a ableitbaren Achsenverhältnisse liegen ebenfalls in dieser Größenordnung (8-9:1, 10:1). Bei einem Molekulargewicht von 77500 D errechnen sich damit apparente Moleküldimensionen von 306 Å Länge und 31 Å Dicke.
Die an Hand der hydrodynamischen Untersuchungen abgeleiteten Parameter sind in guter Übereinstimmung mit den von Byers et al. (1979, 1983) angegebenen Werten. Ihre Auswertung der Daten und die dieser Arbeit basieren auf einem Molekulargewicht von 78000-80000 D auf Grund der Untersuchungsergebnisse. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Byers et al. wird auch in dieser Arbeit ein minimaler Stokesscher Radius von 52 Å bestimmt. Die in ihrer Arbeit zu beobachtende Aggregation führte aber bei höherer Proteinkonzentration zu sehr viel höheren Werten (bei 10 mg/mL: 69-70 Å), wobei noch kein Endpunkt erreicht zu sein schien (Byers et al., 1979).
Angaben zur intrinsischen Viskosität machten sie nur für die isolierten Untereinheiten bzw. für den aus den Untereinheiten rekonstuierten IC-Komplex. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die intrinsische Viskosität des Gesamttroponins liegen zwischen dem für den IC-Komplex (8.7 bzw. 6.9 mL/g für +,- Ca^{2+}) und dem der TnT-Untereinheit, die offensichtlich als Tetrameren-Aggregat in nicht denaturierendem Medium vorliegt (η = 15-20 mL/g) (Byers und Kay, 1982b). Für alle Untereinheiten ermittelten Byers et al. eine asymmetrische Struktur, die sich sowohl in den Sedimentationskonstanten, den Stokesschen Radien als auch in den Werten für die intrinsische Viskosität widerspiegelte. Auf Grund der starken Assoziationsphänomene gaben sie für den Gesamttroponinkomplex keinen

$S^{o}_{20,W}$-Wert an; an Hand der Gelfiltrationsergebnisse berechneten sie einen Wert von 3.65 S für ein Molekulargewicht von 80000 D. (Byers et al., 1979). Für den IC-Komplex bestimmten sie einen $S^{o}_{20,W}$-Wert von 2.9 S (Byers und Kay, 1982b). Für einen TI-Komplex beobachteten sie einen apparenten Stokesschen Radius zwischen 50-60 Å, in dem die TnT-Untereinheit aus ihrem normalen tetrameren Aggregationszustand herausgelöst war.
Die Untersuchungen von Byers et al. (1979) an dem nativ isolierten Troponin sind hauptsächlich in einem 0.2 M KCl-Puffer durchgeführt worden, während die Messungen an den isolierten Untereinheiten TnI und TnT und an den rekonstituierten Komplexen aus den drei Untereinheiten in einem 0.5 M NaCl-Puffer erfolgten (Byers und Kay, 1982 b; 1983). Im Bereich niedrigerer Proteinkonzentration stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den vergleichbaren Ergebnissen von Byers et al. (1979, 1982 b) gut überein. Die Phosphatgruppen des in dieser Arbeit präparierten Komplexes üben anscheinend keinen wesentlichen Einfluß auf die äußere Struktur des Troponins aus. Sowohl der Phospho- wie auch der (vermutete) Dephospho-Troponinkomplex von Byers et al. (1979) zeigen bei Extrapolation gegen unendliche Proteinverdünnung eine gleiche Struktur. Daß auch eine andere Möglichkeit denkbar gewesen wäre, zeigt ein Beispiel des Myosins aus Nicht-Muskel-Zellen oder der glatten Muskulatur: Im dephosphorylierten Zustand der 20000 D P-Leichten Kette faltet sich das Molekül zusammen und bildet eine kompakte Struktur. Erst die Phosphorylierung dieser Leichten Ketten führt zu einer Entfaltung und Streckung des Myosin-Monomeren, Voraussetzung für die Aggregation und Bildung eines funktionsfähigen dicken Filaments (Kendrick-Jones et al., 1983).
Die Unterschiede für die Messungen bei Proteinkonzentrationen oberhalb von 3 mg/mL, die sich zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den Untersuchungen am nativ isolierten Komplex zeigen (Byers et al., 1979) sind zumindest teilweise durch die verschiedenen Salzkonzentrationen in den Puffern zu erklären. Aber auch die $S_{20,W}$-Werte, die Byers et al. (1979) auf Grund von Messungen in 0.5 bzw. 1.0 M KCl-Puffern bestimmen, liegen noch höher als die in dieser Arbeit bestimmten Werte. Die drei Phosphatgruppen in dem in dieser Arbeit präparierten Troponinkom-

plex können offensichtlich der Assoziation der einzelnen Moleküle entgegenwirken. Darüber hinaus werden die Wechselwirkungen der Untereinheiten, besonders zwischen der TnI- und der TnC-Untereinheit verändert, wenn es möglich ist, allein durch Gelfiltration in Abwesenheit der zweiwertigen Metallionen Mg^{2+} und Ca^{2+} die TnC-Untereinheit aus dem Gesamtkomplex herauszulösen (Kap. 3.7.3.). In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß jeweils in unmittelbarer Nähe zu den TnC-Bindungsseiten an der TnI-Untereinheit die Phosphorylierungsseiten Ser-20 und Ser-146 der TnI-Untereinheit liegen. Eine spezifische Kontrolle der TnI-TnC-Wechselwirkung scheint durch die Phosphorylierung an der TnI-Untereinheit ausgeübt zu werden.
Auch im Vergleich mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Troponins zeigen sich gute Übereinstimmungen zwischen den dabei ermittelten Dimensionen des Troponins (Ohtsuki und Shirashi, 1982; Flicker et al., 1982) und den für das Ellipsoidmodell errechneten Werten (s. Kap. 3.8.1.). Flicker et al. bestimmen für das Skelettmuskel-Troponin eine zweiteilige Kopf-Schwanz-Struktur, die insgesamt eine Länge von etwa 265 Å besitzt. Der Schwanzteil, mit einer Länge von allein etwa 160 Å, entspricht in seiner Struktur der TnT-Untereinheit, während der etwas abgeflachte, eher globuläre Kopfteil, aufgebaut aus den Untereinheiten TnI und TnC, einen Durchmesser von etwa 100 Å zeigt.
Die etwas größeren Dimensionen (306 Å Länge), die für das Troponin dieser Arbeit ermittelt werden können zum einen durch die größeren Untereinheiten des Herzmuskel-Troponins hervorgerufen sein (Δ = 6000 D). Außerdem wird bei der Ableitung des Ellipsoid-Modells keine weitere Strukturierung innerhalb des realen Moleküls angenommen, so daß sich Dimensionsunterschiede in einzelnen Bereichen des Moleküls, die sich in einer Vergrößerung der hydrodynamischen Daten (Sedimentationskonstante oder Viskosität) auswirken, bei der Berechnung eines allgemeinen, linear gedachten Modells in einer Vergrößerung des Achsenverhältnisses zeigen.
Bemerkenswert ist noch die Beobachtung, daß der globuläre TnI-TnC-Teil manchmal vom Tropomyosin abdissoziieren kann und in

Richtung auf den N-terminalen Teil der TnT-Untereinheit abgeknickt ist (Flicker et al., 1982). Auch Ohtsuki und Shiraishi (1982) berichten, daß manchmal neben dem von ihnen hauptsächlich beobachteten globulären Molekülkomplex ein stabförmiger Anhang zu sehen ist. Es besteht offensichtlich die Möglichkeit, daß der globuläre Restteil des Troponins mit dem N-terminalen Bereich der TnT-Untereinheit in Wechselwirkung tritt.

In diesem Zusammenhang sind Beobachtungen aus der Arbeitsgruppe von L. Smillie beachtenswert: Sie finden, daß die N-terminale Hälfte der (Skelettmuskel) TnT-Untereinheit im Überlappungsbereich der Tropomyosin-Moleküle binden kann, andererseits aber auch, abhängig von der Salzkonzentration im Puffer, bei hoher Salzkonzentration in Wechselwirkung mit den Untereinheiten TnT und TnC treten kann (Pearlstone und Smillie, 1980). Die C-terminale Hälfte der TnT-Untereinheit besitzt Bindungsseiten für die TnI-, die TnC-Untereinheit und für das Tropomyosin.

Der Komplex aus den Untereinheiten TnI, TnC und dem C-terminalen Fragment der TnT-Untereinheit bindet in der Nähe des Cys-190 des Tropomyosins, etwa ein Drittel der Tropomyosinlänge von der Kopf-Schwanz-Polymerisationsstelle des Tropomyosins entfernt. Diese Bindung erfolgt aber nur im Ca^{2+}-freien Zustand des Komplexes. Bindung von Ca^{2+}-Ionen an diesen Fragmentkomplex bewirkt die Loslösung vom Tropomyosin (Pearlstone und Smillie, 1983). Bei intakter TnT-Untereinheit wäre die Bindung des Komplexes an das Tropomyosin weiterhin durch den N-terminalen Teil der TnT-Untereinheit bewirkt worden. Eine Wechselwirkung der TnI- und der TnC-Untereinheiten ist deshalb auch mit dem normalerweise entfernten N-Terminus der TnT-Untereinheit vorstellbar. Jahnke und Heilmeyer (1983) konnten eine Beeinflussung der Tropomyosin-Polymerisation durch die Bindung des Phospho-TnT-Troponins aus dem Skelettmuskel nachweisen.

4.6. ^{31}P-kernresonanzspektroskopische Untersuchungen am Phosphotroponin

Während durch die hydrodynamischen Untersuchungen Strukturgrößen des Holotroponins zu erhalten sind, wie sie der Gesamtkomplex in Lösung zeigt, so ist es mit Hilfe der ^{31}P-NMR-Spektroskopie möglich, lokale Veränderungen in oder an dem Komplex bzw. den Untereinheiten und ihren Wechselwirkungen aufzuzeigen.
Die Phosphorylierung der TnI-Untereinheit, und hier speziell die Phosphorylierung an der Ser-20-Seite, hatte zu einer Veränderung bzw. Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des Troponins geführt: Die Erniedrigung der Ca^{2+}-Sensibilität der Aktomyosin-ATPase-Aktivität, die nach ß-adrenerger Stimulation und dadurch bedingte Phosphorylierung der TnI-Untereinheit des Troponins zu beobachten ist (Bailin et al., 1979; Holroyde et al., 1979; Mope et al., 1980), findet ihre Entsprechung in einer Erniedrigung der Ca^{2+}-Bindungsaffinität des Troponin-Komplexes, der an der TnI-Untereinheit phosphoryliert worden ist (Robertson et al., 1982 a). Da aber die Ca^{2+}- (bzw. die Metallionenbindung) über die TnC-Untereinheit erfolgt, die inhibitorische Untereinheit jedoch diejenige ist, die phosphoryliert wird, so muß die Veränderung der Ca^{2+}-Abhängigkeit auf einer Veränderung der Wechselwirkung zwischen diesen beiden Untereinheiten (oder allen drei Untereinheiten) beruhen.
Bei der Diskussion der Wechselwirkungen der Herzmuskel-Troponin-Untereinheiten miteinander muß berücksichtigt werden, daß in der Literatur eine sehr viel größere Anzahl von Arbeiten sich mit der Wechselwirkung der Skelettmuskel-Troponinuntereinheiten befaßt. Die Primärsequenzen aller drei Untereinheiten sind bekannt (TnT: Pearlstone et al., 1976; TnI: Wilkinson und Grand, 1975; TnC: Collins et al., 1973), und so lassen sich die Bindungsbereiche präzise lokalisieren. Für das Herzmuskel-Troponin sind nur die Primärsequenzen der TnI-Untereinheit (aus dem Kaninchenherzmuskel) (Grand et al., 1976) und der TnC-Untereinheit (aus dem Rinderherzmuskel) (Van Eerd und Takahashi, 1976) bekannt. In der Herzmuskel-TnC-Untereinheit

vermag eine niedrigaffine Ca^{2+}-Bindungsseite nach Substitution zweier Asparaginsäure-Reste durch hydrophobe Aminosäuren (Van Eerd und Takahashi, 1976) Ca^{2+} nicht mehr zu binden. Die TnI-Untereinheit des Herzmuskel-Troponins ist um 26 Aminosäuren am N-Terminus verlängert. Sie zeigen aber dennoch große Übereinstimmungen zu den homologen Proteinen des Skelettmuskels. Es ergeben sich somit gute Voraussetzungen, Ergebnisse aus Untersuchungen mit den Skelettmuskel-Proteinen den entsprechenden Bereichen der Herzmuskel-Untereinheit zuzuordnen und auch mit ihrer Aminosäuresequenz anzugeben (s. Abb. 1).

In dieser Arbeit ist der Troponin-Komplex entweder mit Ca^{2+} und /oder Mg^{2+} gesättigt bzw. in seiner metallionenfreien Form eingesetzt worden, um unter diesen Bedingungen die maximalen Veränderungen beobachten zu können.

Als prinzipielle Veränderung in den ^{31}P-NMR-Spektren des Herzmuskel-Troponins kann auf die Zugabe des Metallionen eine Veränderung des Protonierungsgrades der Phosphoserinreste beobachtet werden. Für die Phosphatgruppen der TnI-Untereinheit heißt das, daß mit der Bindung sowohl des Ca^{2+} wie auch des Mg^{2+} das Ser-20-Phosphat eine stärkere Protonierung aufweist als im metallionenfreien Zustand. Umgekehrt zeigt die Ser-146-Phosphatgruppe eine stärkere Protonierung im metallionenfreien Zustand. Nach der Bindung der Metallionen erniedrigt sich der Protonierungsgrad, wie aus der Verschiebung des Signals zu niedrigerem Feld zu ersehen ist (Abb. 24, A,B,C). Das TnT-Phosphat zeigt offensichtlich nur bei Mg^{2+}-Sättigung eine Veränderung der Protonierung.

^{31}P-NMR-Untersuchungen von Phosphoaminosäuren, die in einem Protein integriert waren, wurden verstärkt erst in den letzten Jahren durchgeführt, da in der Regel ein ungünstiges Verhältnis von einigen wenigen Phosphatgruppen in einem Komplex mit großem Molekulargewicht verhältnismäßig lange Akkumulationszeiten für die Aufnahme der Spektren voraussetzte, was besondere Anforderungen an die Stabilität der Substanzen stellte. Die Abhängigkeit der Phosphoaminosäure-Signale von den Metallionen Ca^{2+} oder Mg^{2+} wurde erst in einigen wenigen Fällen untersucht.

Generell läßt sich sagen, daß in allen bislang untersuchten Fällen, die eine Abhängigkeit der ^{31}P-NMR-Signale von der Metallionenkonzentration zeigten, die Zugabe von Mg^{2+} oder Ca^{2+} eine Verschiebung der jeweiligen NMR-Signale in Richtung zu höherer Feldstärke hervorriefen: -0.6 ppm für das Phospho-3-Histidin in der E.coli Succinyl-CoenzymA-Synthetase in Anwesenheit von 2.5 mM $MgCl_2$ (Vogel und Bridger, 1982a); -0.4 ppm für die Phosphoserinresonanzen der Speicheldrüsen-Proteinie mit 50 mM $CaCl_2$ (Bennick et al., 1981) oder -0.25 bzw. -0.35 ppm für die zwei Phosphoserinsignale des Ovalbumins mit 15 mM $MgCl_2$ (Vogel und Bridger, 1982b). Die aufgeführten Phosphoseryl-Reste waren ungehindert protonentitrierbar, d.h. waren an der Oberfläche der Proteine lokalisiert. Die Signale zeigten eine geringe Linienbreite, die auf eine hohe Beweglichkeit der Phosphatgruppen schließen läßt. Eine Verschiebung der ^{31}P-NMR-Signale zu tieferem Feld, wie es für das Signal des Ser-146 nach der Mg^{2+}-Zugabe beobachtet werden kann (+ 0.12 ppm), wurde bislang noch nicht beschrieben. In der Regel wurden diese Veränderungen der ^{31}P-NMR-Signale mit einer Komplexierung mit den Metallionen oder durch die Nähe des Phosphatrestes zu der Metallionen-Bindungsseite interpretiert, so für die Ca^{2+}-Bindung der Speicheldrüsen-Proteine oder die Mg^{2+}-Bindung an die Succinyl-CoA-Synthetase.
In keinem der Fälle wurde jedoch eine Vergrößerung der Linienbreite der jeweiligen Signale nach der Mg^{2+} oder Ca^{2+}-Zugabe beschrieben, wie sie bei einer direkten Beteiligung der Phosphatgruppe an der Metallionen-Bindung durch die Immobilisierung der Phosphatgruppe zu beobachten sein sollte. Auch sollte bei einer direkten Komplexierung der Phosphatgruppe eher eine Verschiebung zu tieferem Feld zu erwarten sein (James, 1975), wie es z.B. bei der Bildung des MgATP-Komplexes aus freiem ATP zu beobachten ist (Cohn und Hughes, 1962). Eine mögliche Beeinflussung der Bindungsgeometrie am Phosphoserinrest sollte ebenfalls auszuschließen sein, da dadurch eine Verschiebung zu niedrigerem Feld zu beobachten wäre (Boch und Sheard, 1975).

Da sich die Veränderung der chemischen Verschiebung auf Grund der Metallionenzugabe nicht von einer veränderten Protonierung unterscheidet, ist die Interpretation nicht von der Hand zu

weisen, daß durch die Metallionenbindung an das Protein tatsächlich eine Veränderung der Protonierung der Phosphatgruppen hervorgerufen wird.
Für die TnC-Untereinheit, ein saures Protein mit einem außergewöhnlich hohen Anteil an Asparagin- und Glutaminsäuren (Van Eerd und Takahashi, 1976), ist gezeigt worden, daß ein Teil der Carboxylgruppen einen pK_s-Wert von 6.0 besitzt. Die Verschiebung des pK_s-Wertes ist durch die Vielzahl der Carboxylfunktionen und ihre Nähe zueinander bedingt (McCubbin und Kay, 1980). Mit einem solchen pK_s-Wert liegen aber die Carboxylgruppen in einem Bereich, der auch für die zweite Protonierungsstufe einer Phosphoserylgruppe typisch ist. Wechselwirkungen zwischen den Phosphatgruppen der TnI-Untereinheit mit einer oder einigen Carboxylfunktionen der benachbarten TnC-Untereinheit sollten nicht auszuschließen sein.
Die Phosphorylierungsseiten der TnI-Untereinheit sind jeweils in Nachbarschaft zu den Bindungsseiten der TnC-Untereinheit an die TnI-Untereinheit zu finden (s. Abb. 1).
Eine Wechselwirkung mit benachbarten, protonentitrierbaren funktionellen Gruppen ergibt sich auch aus der Zunahme der Linienbreite der ^{31}P-NMR-Signale, die mit steigender Protonenkonzentration bei der pH-Titration der Phosphoseringruppen beobachtet wird (s. Tab. 13). Ein solches Verhalten, daß auf eine kooperative Beeinflussung der Phosphoseringruppen durch andere geladene Gruppen schließen läßt, wurde z.B. bei der pH-Titration der Phosphoserine des Ovalbumins nicht festgestellt (Vogel und Bridger, 1982a). Für das Ovalbumin wurde dieses Verhalten damit erklärt, daß der Wechsel zwischen protoniertem und deprotoniertem Zustand ein schneller Prozess im Bezug zur NMR-Zeitskala sei. Demgegenüber besitzen im Herzmuskel-Troponin die monoanionischen Zustände der Phosphoseringruppen eine größere Lebensdauer und tragen somit mehr zur Linienbreite bei.

Die TnI-TnC-Bindungsbereiche (s.o., Abb. 1) lassen sich in ihrer Bedeutung differenzieren. Für die Skelettmuskel-TnI-Untereinheit konnte gezeigt werden, daß die C-terminale Bindungsseite eine Ca^{2+}-unabhängige bzw. mit den Ca^{2+}-hochaffinen Seiten der TnC-Untereinheit wechselwirkende Bindungsseite ist (Syska et al., 1976; Dalgarno et al., 1982).

Im Ca^{2+}-freien Zustand bzw. bei einer Ca^{2+}-Konzentration von ca 50 nM erfolgt eine Bindung der TnC-Untereinheit über diese TnI-Seite. Sättigung der Ca^{2+}-spezifischen (niedrigaffinen) Seiten der TnC-Untereinheit führt zusätzlich zu einer Wechselwirkung an der N-terminalen TnI-Bindungsseite (Dalgarno et al., 1982), eine Wechselwirkung, die als entscheidend für die Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der TnI-Untereinheit auf die Aktomyosin-ATPase angesehen wird (Robertson et al., 1981) (s. Abb. 28).
Die Bindung von Ca^{2+}- oder Mg^{2+}-Ionen an das metallionenfreie Herzmuskel-Troponin kann durch die ^{31}P-NMR-Messungen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die TnI-Untereinheit nicht unterschieden werden. In beiden Fällen ist eine gleiche Beeinflussung der Phosphoserylsignale festzustellen. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß für die Mg^{2+}-Sättigung des Troponins eine (unphysiologisch) hohe Mg^{2+}-Konzentration eingesetzt wurde, die zu einer der Ca^{2+}-Sättigung äquivalenten Strukturänderung geführt haben könnte.
Der Phosphoserylrest der TnT-Untereinheit wird, abgesehen von der pH-Abhängigkeit, offensichtlich nur durch die Bindung von Mg^{2+}-Ionen in seiner chemischen Verschiebung beeinflußt. Für das Skelettmuskel-Troponin berichteten Jahnke und Heilmeyer (1980), daß durch die Dephosphorylierung der TnT-Untereinheit die Mg^{2+}-Bindungseigenschaften des Komplexes deutlich beeinflußt wurden, nicht aber die Ca^{2+}-Bindungseigenschaften. Eine 30fache Erniedrigung der Mg^{2+}-Bindungsaffinität wurde beobachtet. Weder Jahnke et al. (Jahnke, Schnackerz und Heilmeyer, unveröffentliche Ergebnisse) noch Sperling et al. (1979) konnten allerdings eine Abhängigkeit des Phosphoserin-Signals des Skelettmuskel-Troponins von den zugesetzten Metallionen Mg^{2+} oder Ca^{2+} feststellen. Im Gegensatz zum Herzmuskel-Troponin ist für den Skelettmuskel-Komplex nur 1 ^{31}P-NMR-Hauptsignal zu beobachten. Eine Veränderung der chemischen Verschiebung um nur einen geringen Beitrag ist deshalb nicht so deutlich auszumachen wie für das Herzmuskel-Troponin, wo diese Verschiebung relativ zu den anderen Phosphoserinsignalen gesehen wird. Da Dobrovol'skij und Gusev (1982) keine Beeinflussung der

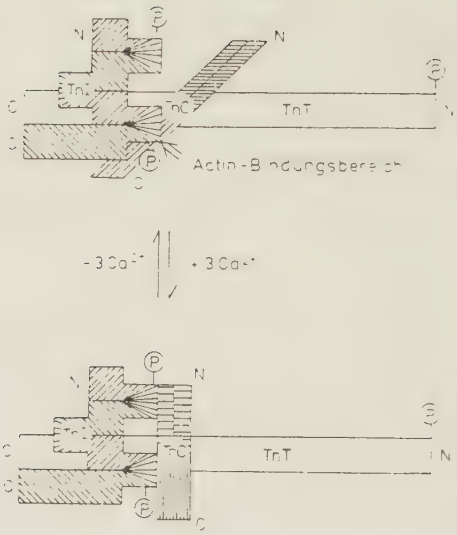


Abb. 28: Modell der Wechselwirkungsveränderung zwischen den Untereinheiten des Troponins für den Ca^{2+}-freien und gesättigten Komplex

Die Abbildung stellt den Versuch dar, die Veränderungen der Wechselwirkungen besonders zwischen der TnI- und der TnC-Untereinheit beim Übergang vom Ca^{2+}-freien zum -gesättigten Troponinkomplex darzustellen. Die Lokalisation der TnI- und der TnC-Untereinheit im Bezug zu TnT-Untereinheit wurde auf Grund der Ergebnisse von Ontsuki (1980), Flicker et al. (1982) und Chong und Hodges (1982) gewählt. Der (doppelt)-S-förmigen Darstellung der TnI-Untereinheit liegen Ergebnisse von Perry (1979) und Dalgarno et al. (1982) zugrunde, die gestreckte Form der TnC-Untereinheit ergibt sich aus Ergebnissen von Byers und Kay (1982).
Die in Nachbarschaft zu den TnC-Bindungsseiten lokalisierten TnI-Phosphorylierungsseiten (im Herzmuskel: Ser-20 und Ser-146) erfahren die Veränderung ihrer chemischen Umgebung (durch die Annäherung der TnC-Untereinheit an die Ser-20-Phosphatgruppe bzw. durch die starke Konformationsänderung der hochaffinen Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsseiten in der Nähe der Ser-146-Seite) in einer Veränderung ihres Protonierungsgrades. Dies ist durch einen Wechsel der benachbarten, ionisierbaren, protonenbindenden Gruppen erklärbar.

Metallionen-Bindungseigenschaften des Skelettmuskel-Troponins durch die TnT-Phosphorylierung (bzw. -Dephosphorylierung) feststellten, ist die Frage als noch zu beantworten anzusehen.

Durch die Phosphorylierung der TnI-Untereinheit des Herzmuskels wird nach allgemein akzeptierter Vorstellung (Robertson et al., 1982) die Calciumbindungsaffinität des Troponins erniedrigt und damit die Ca^{2+}-Sensitivität der Aktomyosin-ATPase. Mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen besteht nun eine Möglichkeit, die Ursache dieses Phänomens zu beschreiben.

Die Bindungskonstante für Ca^{2+} an den Ca^{2+}/Mg^{2+}- und an der Ca^{2+}-spezifischen Bindungsseite der TnC-Untereinheit wird durch die Komplexierung mit der TnI-Untereinheit um etwa eine Zehnerpotenz erhöht (Holroyde et al., 1980). Die Ursache für diese Affinitäterhöhung wird in einer Prästrukturierung der metallionenfreien TnC-Untereinheit gesehen, durch die eine Bindung der Metallionen an die TnC-Untereinheit erleichtert wird. Wird nun, wie im Falle des Herzmuskel-Troponins (für das eine solche Phosphorylierung nachgewiesen wurde), durch die Einführung von Phosphatgruppen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den TnI-TnC-Bindungsseiten lokal die negative Partialladung erhöht, so sollte dadurch die Wechselwirkung zwischen der TnI- und der negativ geladenen (sauren) TnC-Untereinheit deutlich beeinflußt werden. Die Bindung der TnC-Untereinheit sollte nicht mehr so stark ausgeprägt werden können wie im Falle der nicht phosphorylierten TnI-Untereinheit. Besonders deutlich sollte dieser Effekt zu beobachten sein, wenn die involvierten negativ geladenen Gruppen nicht durch Protonenbindung in ihrer Ladung neutralisiert sind, d.h. bei pH-Werten zwischen 7.0 - 7.4, dem physiologischen pH-Bereich der nichtaktivierten Herzmuskelzelle. Die Schwächung der TnI-TnC-Wechselwirkung durch die Phosphorylierung, die sich auch bei der Dissoziation der TnC-Untereinheit bei den Gelfiltrationsexperimenten des Kap. 3.7.3. gezeigt hat, sollte bewirken, daß die Ca^{2+}-Bindungsaffinität des phosphorylierten Gesamtkomplexes mehr der Ca^{2+}-Affinität der isolierten TnC-Untereinheit entspricht. Die Verschiebung der Ca^{2+}-Bindungskonstanten des phosphorylierten Herzmuskel-Troponinkomplexes für die Ca^{2+}-spezifische Seite in Richtung zu niedrigeren Werten steht im Einklang mit dieser Überlegung.

Mit der Erklärung, in welcher Weise die Phosphoserinreste durch die Bindung der Metallionen an den Troponinkomplex beeinflußt werden und wie durch die Phosphorylierung generell die Bindungseigenschaften des Gesamtkomplexes verändert werden, ist die Frage nach einer möglichen Bedeutung des Phosphateinbaus nicht beantwortet worden. Die Erniedrigung der Ca^{2+}-Bindungsaffinität durch die TnI-Phosphorylierung, durch die letztlich die Kontraktionsinitiierung insensitiver für das sie auslösende Ca^{2+}-Signal wird, kann nicht als Begründung für diese Phosphorylierung angesehen werden. Als eine Erklärung wurde die Verstärkung der Relaxationsphase nach einer Kontraktion angegeben, die sich auf Grund einer schnelleren Dissoziation der Ca^{2+}-Ionen vom Troponin ergibt (Robertson et al., 1982).

Bei der Interpretation der Phosphorylierung der TnI-Untereinheit des Herzmuskel-Troponins sollten die physiologischen Bedingungen berücksichtigt werden, unter denen es zu dieser Reaktion kommt. Die Phosphorylierung an der Ser-20-Seite erfolgt nach ß-adrenerger Stimulation durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Eine solche ß-adrenerge Stimulation erfolgt in Situationen, in denen eine kurzfristige Leistungssteigerung des Herzmuskels unter teilweise anaeroben (hypoxischen) Bedingungen erreicht werden muß; langfristig muß eine erhöhte Leistung aufrecht erhalten bleiben. ^{31}P-NMR-Messungen an intakten Muskelzellen haben in den letzten Jahren gezeigt, daß unter diesen Bedingungen der intrazelluläre pH-Wert abfällt (C.T. Burt, 1981). Der Grund hierfür dürfte in einer Aktivierung der Aktomyosin-ATPase und der Initiierung der Glykolyse zu sehen sein, die zumindest zu Beginn der Kontraktion zeitweise unter Sauerstoff-defizitären Bedingungen erfolgen muß. Dieser Protonenproduktion steht zu Beginn der Kontraktion nur ein Verbrauch durch die Resynthese von ATP aus ADP und Kreatinphosphat gegenüber. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration im intrafibrillären Bereich ist zumindest nicht auszuschließen (Jacobus und Lehninger, 1973).

Da außerdem die für die Resynthese des ATP notwendige Kreatinkinase teilweise in anderen Zellkompartimenten (Z-Scheibe, Mitochondrienmembran) lokalisiert ist (Wallimann, et al., 1977a,d), muß ein H_3O^+-Transport in diese Richtung erfolgen.
Die pH-Pufferung erfolgt langfristig sicherlich durch eine erhöhte Respiration und Stimulation der Kreatinkinase (Saks et al., 1980). Die kurzfristige und lokale pH-Pufferung im Filamentbereich der A-Bande wird jedoch auch auf die Pufferkapazität der umgebenden Proteine zurückgreifen. Durch eine Protonenbindung an ein Protein wird aber eine Ladungsveränderung und damit die Veränderung der Struktur einzelner Proteinkomponenten bzw. der Wechselwirkung mit anderen Komplexteilen bewirkt.
Für die TnC-Untereinheit ist an Hand von Circulardichroismus- und Tyrosyl-Fluoreszenzuntersuchungen (Lehrer und Leavis, 1974) sowie durch kalorimetrische Messungen (Ingraham und Swenson, 1983) gezeigt worden, daß Protonenbindung an dieser an Carbonsäuren reichen Untereinheit gleiche oder weitgehend ähnliche Konformationsveränderungen und Stabilisierungen hervorrufen kann, wie sie auch durch die Metallionenbindung erfolgen. Zum anderen konnte Godt (1981) in einer Modellrechnung zeigen, daß allein durch die Ladungsveränderungen an der Oberfläche des dünnen Filaments durch Protonenbindung eine Erniedrigung der dort herrschenden, effektiven Ca^{2+}-Konzentration erzielt werden kann, so daß für eine Ca^{2+}-abhängige Aktivierung der Aktomyosin-ATPase eine höhere Ca^{2+}-Konzentration im Medium (Sarkoplasma) notwendig ist. Protonentitrierbare (ionisierbare) Gruppen mit einem pK_a-Wert von 6.1 sollen bei diesem Prozeß involviert sein (Godt, 1981), ein pK_a-Wert, der gut mit dem für einige Carboxylgruppen der TnC-Untereinheit übereinstimmt (McCubbin und Kay, 1980). Die Einführung negativer Ladungen durch Oberflächenphosphatgruppen mittels cAMP-abhängiger TnI-Phosphorylierung könnte nun bewirken, daß zumindest lokal an Stellen, wo eine konstante Ca^{2+}-abhängige Wechselwirkung erwünscht ist, etwa im Bereich der TnI-TnC-Bindungsstellen, Ladungsbedingungen trotz Erhöhung der

Protonenkonzentration erhalten bleiben, wie sie vor dem Zeitpunkt der Aktivierung der Muskelkontraktion ohne Phosphorylierung vorgelegen haben. Die biologische Bedeutung der Phosphatgruppen wäre demnach darin zu sehen, einen Ladungsausgleich herzustellen, als lokale Puffersubstanz zu wirken, um im Falle einer erhöhten Protonenbildung ein Übergreifen der Protonen auf die TnC-Untereinheit zu verhindern. Der Phosphorylierung könnte eine Art Rückstellmechanismus zugesprochen werden, so daß die Aktomyosin-ATPase-Aktivität auch bei erhöhter H_3O^+-Konzentration in ihr Ca^{2+}-Sensitivität nicht beeinflußt würde. Durch die erhöhte Ca^{2+}-Austauschrate des phosphorylierten Troponins bei neutralem pH-Wert wird mit einer Steigerung der Relaxationsphase ein weiterer, physiologisch sinnvoller Effekt erreicht.

Zusammenfassung

Durch Modifikation und Erweiterung des Tsukui/Ebashi-Präparationsverfahrens gelingt es, Herzmuskeltroponin unter Protease- und Phosphatase-inaktivierenden Bedingungen in guten Ausbeuten mit einem durchschnittlichen Phosphatgehalt von 2.26 Mol P/77500 g Troponin zu isolieren, ein wesentlich höherer Wert als bislang bestimmt wurde. In Übereinstimmung mit dem Phosphatgehalt, der für die einzelnen Untereinheiten ermittelt wird (0.7 Mol P/TnT; 1.4 Mol P/TnI), und der isoelektrischen Fokussierung des Troponins können der TnT-Untereinheit eine Phosphorylierungsseite, der TnI-Untereinheit zwei Phosphorylierungsseiten zugeordnet werden, die auf Grund ihres Verhaltens an Hand von Literaturangaben als Ser-1 (TnT), Ser-20 und Ser-146 (TnI) identifiziert werden können.
Hydrodynamische Untersuchungen des isolierten Phosphotroponins zeigen, daß auch dieser Komplex bei höheren Proteinkonzentrationen aggregiert. Modellrechnungen deuten auf eine parallele Anordnung der Moleküle in diesem Aggregat.
Eine minimale Sedimentationskonstante $S^{o}_{20,W}$ von 3.60S wird für den Troponinkomplex ermittelt. Verschiedene hydrodynamische Daten (Sedimentationskonstante, Stokesscher Radius an Hand von Gelfiltrationsexperimenten, intrinsische Viskosität) ergeben übereinstimmend, daß der Troponinkomplex ein stark asymmetrisches Molekül ist, das in seinen hydrodynamischen Eigenschaften durch ein langgestrecktes Ellipsoid mit einem Achsenverhältnis von 10:1 darzustellen ist. Daraus lassen sich Moleküldimensionen von 306 Å Länge und 31 Å Dicke berechnen, in guter Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Skelettmuskel-Troponin.
Die bis zu vier ^{31}P-NMR-Signale, die für den Phosphotroponinkomplex gefunden werden, lassen sich zumindest für die Mg^{2+}-haltigen Komplexe gut auflösen. Sie werden als Phosphoserin-Signale identifiziert. Durch Vergleich mit ^{31}P-NMR-Spektren einer Troponinprobe, in der durch Inkubation mit alk. Phosphatase aus Kälberdarm das TnT-Phosphat ausgebaut worden ist, durch pH-Titration der Phosphoseryl-Reste eines Mg^{2+}-Troponin-Komplexes und Vergleich der Signalintensitäten

mit der naßchemisch bestimmten Phosphatverteilung auf die einzelnen Phosphorylierungsseiten lassen sich die einzelnen Signale diesen Seiten zuordnen. Auf Grund dieser Zuordnung kann man sagen, daß sich durch die Bindung der Metallionen Ca^{2+} und Mg^{2+} an den Troponinkomplex der Protonierungsgrad der Ser-20 und der Ser-146 Phosphate in entgegengesetzter Weise änderte. Eine stärkere Bindung der TnC-Untereinheit im Bereich der TnI-TnC-Bindungsseite (27-48) im metallionengebundenen Zustand wird als Erklärung für diese Beobachtung angenommen. Das TnT-Phosphat zeigt nur auf die Zugabe von Mg^{2+}-Ionen eine Veränderung in seiner chemischen Verschiebung.

Die in der Literatur beschriebene Erniedrigung der Ca^{2+}-Bindungsaffinität durch die TnI-Phosphorylierung kann an Hand der veränderten Ladungsverhältnisse im TnI-TnC-Bindungsbereich erklärt werden. Ein Modell für die biologische Bedeutung der Phosphorylierungsreaktion wird aufgestellt; nach diesem Modell kommen den Phosphoserylresten im Phosphotroponin eine Funktion als Puffersubstanzen zu, durch die einer möglichen Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten durch Protonenbindung entgegengewirkt wird.

Literaturverzeichnis

N.G. Anderson und N.L. Anderson	(1978) Analytical Biochemistry 85, 331-340
G. Bailin	(1979) Am. J. Physiol. 236, C41 - C46
G.R. Bartlett	(1959) J. Biol. Chem. 234, 466-468
J.A. Beavo, P.J. Bechtel und E.G. Krebs	(1974) Methods Enzymol. 38, 209-308
A. Bennick, A.C. McLaughlin, A.A. Grey und G. Madapallimattam	(1981) J. Biol. Chem. 256, 4741-4746
G. Berson, J.-L. Samuel und Bernhard Swynghedauw	(1978) Pflügers Arch. 374, 277-283
J.L. Bock und B. Sheard	(1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 24-30
M.M. Bradford	(1976) Anal. Biochem. 72, 248-254
C.J. Brekke und M.L. Greaser	(1976) J. Biol. Chem. 251, 866-871
C.T. Burt	(1981) in: Cell and Muscle Motility 1, 375-398, eds. R.M. Dowben und J.W. Shay, Prenum Press, New York
L.D. Burtnick, W.D. McCubbin und C.M. Kay	(1975a) Can. J. Biochem. 53, 15-20
L.D. Burtnick, W.D. McCubbin und C.M. Kay	(1975b) Can. J. Biochem. 53, 1207-1213
L.D. Burtnick, W.D. McCubbin und C.M. Kay	(1976) Can. J. Biochem. 54, 546-552
L.D. Burtnick und C.M. Kay	(1976) FEBS Lett. 65, 234-237
L.D. Burtnick und C.M. Kay	(1977) FEBS Lett. 75, 105-110
L.D. Burtnick	(1977) Ph.D. Thesis, University of Alberta
J.E. Buss und J.T. Stull	(1977) FEBS Lett. 73, 101-104
D.M. Byers, W.D. McCubbin und C.M. Kay	(1979) FEBS Lett. 104, 106-110
D.M. Byers und C.M. Kay	(1982) Biochemistry 21, 229-233
D.M. Byers und C.M. Kay	(1982) FEBS Lett. 148, 12-16

D.M. Byers und C.M. Kay (1983) J. Biol. Chem. 258, 2951-2954

Ch.R. Cantor und P.R. Schimmel (1980) Biophysical Chemistry, Part II, W.H. Freeman und Company, San Francisco

C.H. Chervenka (1969) in: A Manual of Methods for the Analytical Ultrazentrifuge, Spinc. Div. of Beckmann Instruments Inc. Palo Alto (California)

S.P. Chock, P.B. Chock und E. Eisenberg (1976) Biochemistry 15, 3244-3253

P.C.S. Chong und R.S. Hodges (1982) J. Biol. Chem. 257, 2549-2555

E.J. Cohn und J.T. Edsall (1943) in: Proteins, Amino Acids und Peptides, S. 370-381, Reinhold, New York

M. Cohn und T.R. Hughes, jr. (1962) J. Biol. Chem. 237, 176-181

H.A. Cole und S.V. Perry (1975) Biochem. J. 149, 525-533

C.-K. Chou, J. Alfano und O.M. Rosen (1977) J. Biol. Chem. 252, 2855-2859

D.C. Dalgarno, R.J.A. Grand, B.A. Levine, A.J.G. Moir, G.M.M. Scott, und S.V. Perry (1982) FEBS Lett. 150, 54-58

G.K. Dhoot, N. Freason und S.V. Perry (1979) Exp. Cell. Res. 122, 339-350

S. Ebashi und M. Endo (1968) Progr. Biophys. Mol. Biol. 18, 123-183

S. Ebashi, J. Ohsuki und K. Mihasi (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 215-223

S. Ebashi, T. Wakabayashi und F. Ebashi (1971) J. Biochem. (Tokyo) 69, 441-445

P.J. England (1976) Biochem J. 160, 295-304

K. Feldmann und W.E. Hull (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 856-860

P.F. Flicker, G.N. Phillips, jr. und C. Cohen (1982) J. Mol. Biol. 162, 495-501

R.E. Godt (1981) Biophys. J. 35, 385-392

R.J.A. Grand, J.M. Wilkinson und L.E. Mole (1976) Biochem. J. 159, 633-641

R.J.A. Grand, J.M. Wilkinson (1977) Biochem. J. 167, 183-192

R.J.A. Grand, B.A. Levine und S.V. Perry (1982) Biochem J. 203, 61-68

M.L. Greaser und J. Gergely (1973) J. Biol. Chem. 248, 2125-2133

M.L. Greaser, M. Yamaguchi, C. Brekke, J.D. Potter und J. Gergely (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 235-244

N.B. Gusev, A.B. Dobrovol'skij und S.E. Severin (1980) Biochem. J. 189, 219-226

N.B. Gusev, N.V. Barskaya, A.D. Verin und I.V. Duzhenkova (1983) Biochem. J. 213, 123-129

K. Hara, Y. Ichihara und K. Takahashi (1983) J. Biochem. 93, 1435-1445

M.J. Hayman (1981) J. Gen. Virol. 52, 1-14

L.M.G. Heilmeyer, jr., B. Koppitz, K. Feldmann, J.E. Sperling, U. Jahnke, K.P. Kohse und M.W. Kilimann (1980) in: Metabolic Interconversion of Enzymes, ed. H. Holzer, 321-334, Springer Verlag Berlin, Heidelberg

M.T. Hincke, W.D. McCubbin und C.M. Kay (1979a) FEBS Letters 83, 131-136

M.T. Hincke, W.D. McCubbin und C.M. Kay (1979b) Can J. Biochem. 57, 768-775

M. Hoerl, K. Feldmann, K.D. Schnackerz und E.J.M. Helmreich (1979) Biochemistry 18, 2457-2464

F. Hofmann und G. Schultz (1980) Arzneim.-Forsch. Drug Res. 30(II) 1991-1995

M.J. Holroyde, E. Howe und R.J. Solaro (1979) Biochim. Biophys. Acta, 586, 63-69

R.J. Holroyde, S.P. Robertson, J.D. Johnson, R.J. Solaro und J.D. Potter (1980) J. Biol. Chem. 255, 11688-11693

W.F. Hull und B.B. Sykes (1975) J. Mol. Biol. 98, 121-153

A.F. Huxley (1957) Progr. Biophys. Chem. 7, 255-318

H.E. Huxley (1972) in: The Structure and Function of Muscle, Vol. I Structure Part 1, G.H. Bourne (ed.), Acad. Press, New York und London

R.H. Ingraham und C.A. Swenson (1983) Eur. J. Biochem. 132, 85-88

I. Isenberg (1979) Annu. Rev. Biochem. 48, 159-191

T.L. James (1975) in: Nuclear magnetic resonance in biochemistry, Academic Press, New York, San Francisco, London; 38-40, 79

U. Jahnke (1977) Diss., Ruhr-Universität Bochum

U. Jahnke und L.M.G. Heilmeyer, jr. (1980) Eur. J. Biochem. 111, 325-332

U. Jahnke und L.M.G. Heilmeyer, jr (1983) Eur. J. Biochem. 133, 591-597

W.E. Jakobus und A.L. Lehninger (1983) J. Biol. Chem. 248, 4803-4810

K. Jaquet (1983) Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

F.J. Jaubert und W.H. Cooke (1958) Can. J. Biochem. 36, 399

J.D. Johnson, J.H. Collins, S.P. Robertson und J.D. Potter (1980) J. Biol. Chem. 255, 9635-9640

J. Kendrick-Jones, W.Z. Caude, P.J. Tooth, R.C. Smith und J.M. Scholey (1983) J. Mol. Biol. 165, 139-162

S.D. Killilea, J.H. Aylward, R.L. Mellgren und E.Y.C. Lee (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 638-646

M.W. Kilimann, K.D. Schnackerz und L.M.G. Heilmeyer, jr. (1983) zur Veröffentlichung eingereicht

J.G. Kirkwood und J. Riseman (1948) J. Chem. Phys. 16, 565

B. Koppitz, K. Feldmann und L.M.G. Heilmeyer, jr. (1980) FEBS Lett. 117, 199-202

J.F. Koretz und E.W. Tayler (1975) J. Biol. Chem. 250, 6344-6350

E.G. Krebs und J.A. Beavo (1979) Annu. Rev. Biochem. 48, 423-461

I.D. Kuntz, jr. und W. Kauzmann (1974) in: Advances in Protein Chemistry 28, ed. C.B. Anfinsen, J.T. Edsall und F.M. Richards, 239-345, Academic Press, New York

P.C. Leavis, S.S. Rosenfeld, J. Gergely, Z. Graberek und Drabikowski (1978) J. Biol. Chem. 253, 5452-5459

P.C. Leavis und E.L. Kraft (1978) Arch. Biochem. Biophys. 186, 411-415

E.Y.C. Lee, Steven R. Silberman, M.K. Ganapathi, S. Petrović und H. Paris (1980) in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 13, eds. P. Greengard und G.A. Robison, Raven Press, New York, 95-131

H.-C. Li (1982) Curr. Top. Cell. Reg. 21, 129-174

H.-C. Li, K.-J. Hsiao und S. Sampathkumar (1979) J. Biol. Chem. 254, 3368-3374

T. Lin und J.Y. Cassim (1978) Biochem. J. 175, 137-147

S. Lowey, H.S. Slayter, A.G. Weeds, H. Baker (1969) J. Mol. Biol. 42, 1-29

O.H. Lowry, N.I. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

A. Mak, L.B. Smillie und M. Bárány (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3588-3592

W.D. McCubbin und C.M. Kay (1980) Acc. Chem. Res. 13, 185-192

A.J.G. Moir, H.A. Cole und S.V. Perry (1977) Biochem. J. 161, 371-382

A.J.G. Moir und S.V. Perry (1977) Biochem. J. 167, 333-343

A.J.G. Moir und S.V. Perry (1980) Biochem. J. 191, 547-554

A.J.G. Moir, R.J. Solaro und S.V. Perry (1980) Biochem. J. 185, 505-513

A.J.G. Moir und S.V. Perry (1982) J. Muscle Res. (Leicester Abstract, private Mitteilung)

A.J.G. Moir, H. Ordidge, R.J.A. Grand, J.P. Trayer und S.V. Perry (1983) Biochem. J. 209, 417-426

R.L. Moss, G.G. Guilian und M.L. Greaser (1983) J. Cell. Biol. 96, 970-978

D.A. Nelson und E.S. Benson (1963) J. Cell. Biol. 16, 297-313

P.Z. O'Farrell, H.M. Goodman und P.H. O'Farrell (1977) Cell, 12, 1133-1142

I. Ohtsuki (1980) in: Muscle Contraction: Its regulatory Mechanisms (Ebashi, S. et al. eds.) 237-249, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo

I. Ohtsuki und F. Shiraishi (1982) Proc. Jap. Acad. 58 Ser. B. 288-290

J.R. Pearlstone, M.R. Carpenter, P. Johnson und L.B. Smillie (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1902-1906

J.R. Pearlstone und L.B. Smillie (1978) Can. J. Biochem. 56, 521-527

J.R. Pearlstone und L.B. Smillie (1980) Can. J. Biochem. 58, 654-659

J.R. Pearlstone und L.B. Smillie (1983) J. Biol. Chem. 258, 2534-2542

S.V. Perry (1979) Biochem. Soc. Trans. 7, 594-616

J.D. Potter (1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 436-441

J.D. Potter (1977) Biophys. J. 17, 118a

J.D. Potter (1982) Meth. Enzymol. 85, 241-263

J.D. Potter und J. Gergely (1974) Biochemistry 13, 2697-2703

S.P. Robertson, J.D. Johnson und J.D. Potter (1981) Biophys. J. 34, 559-569

S.P. Robertson, J.D. Johnson, M.J. Holroyde, E.G. Kranias, J.D. Potter und R.J. Solaro (1982) J. Biol. Chem. 257, 260-264

V.A. Saks, V.V. Kupriyanow, V.G. Elizarova und W.E. Jakobus (1980) J. Biol. Chem. 255, 755-763

K.D. Schnackerz. K. Feldmann, und W.E. Hull (1979) Biochemistry, 18, 1536-1539

K.D. Schnackerz und E.E. Snell (1983) J. Biol. Chem. 258, 4839-4841

K.B. Seamon, D.J. Hartshorne und A.A. Bothner-By (1977) Biochemistry 16, 4039-4046

J. Seymor und E.J. O'Brien (1980) Nature (283), 680-682

J.E. Sperling (1977) Diss., Ruhr-Universität Bochum

J.E. Sperling, K. Feldmann, H. Meyer, U. Jahnke und L.M.G. Heilmeyer, jr. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 581-592

J.T. Stull und J.E. Buss (1977) J. Biol. Chem. 252, 851-857

J.T. Stull und J.E. Buss (1978) J. Biol. Chem. 253, 5932-5938

J.T. Stull (1980) in: Ads. in Cyclic Nucl. Res. 13, 39-93 eds. P. Greengard und G.A. Robison, Raven Press, New York

H.Syska, J.M. Wilkinson, R.J.A. Grand und S.V. Perry (1976) Biochem. J. 153, 375-387

T. Toya-oka und T. Masaki (1979) J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 769-786

R. Tsukui und S. Ebashi (1973) J. Biochem. 73, 1119-1121

J.-P. Van Eerd und K. Takahashi (1976) Biochemistry 15, 1171-1180

H.J. Vogel (1983) Biochemistry 22, 668-674

H.J. Vogel und W.A. Bridger (1982a) Biochemistry 21, 5825-5831

H.J. Vogel und W.A. Bridger (1982b) J. Biol. Chem. 257, 4834-4842

H.J. Vogel, W.A. Bridger und B.D. Sykes (1982) Biochemistry 21, 1126-1132

T. Wallimann, H.J. Kuhn, G. Pelloni, D.C. Turner und H.M. Eppenberger (1977b) J. Cell. Biol. 75, 318-324

T. Wallimann, D.C. Turner und H.M. Eppenberger (1977a) J. Cell. Biol. 75, 297-317

L. Waxman (1978) in: Protein Turnover and Lysosome Function, H.L. Segal und D.J. Doyle, eds., 363-377, Academic Press, Inc. New York

L. Waxman und F.G. Krebs (1978) J. Biol. Chem. 253, 5888-5891

K. Weber und M. Osborn (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

R.A. Weeks und S.V. Perry (1978) Biochem. J. 173, 449-457

S.A. Westwood und S.V. Perry (1981) Biochem. J. 197, 185-193

J.M. Wilkinson (1974) Biochim. Biophys. Acta 359, 379-388

S.G. Withers, N.B. Madsen, B.D. Sykes, M. Takagi, S. Shimomura und T. Fukui (1981a) J. Biol. Chem. 256, 10759-10762

S.G. Withers, N.B. Madsen und B.D. Sykes (1981b) Biochemistry 20, 1748-1756

L.D. Yates und M.L. Greaser (1983) J. Biol. Chem. 258, 5770-5774

D.A. Yphantis (1964) Biochemistry 3, 297-317

H.G. Zot und J.D. Potter (1982) J. Biol. Chem. 257, 7678-7683

Lebenslauf

Norbert Beier, geboren am 7.6.1954 in Hagen als Sohn des Verlagskaufmanns Erich Beier und seiner Frau Agnes, geb. Schmidt. Seit Juni 1983 mit Carola Wittkämper verheiratet.

4/60 - 3/64	Besuch der Eickert-Volksschule in Hagen
4/64 - 4/66	Besuch des Albrecht-Dürer-Gymnasiums in Hagen
4/66 - 7/69	Besuch der Deutschen Auslandsschule Kolleg St. Ludwig in Vlodrop, Niederlande
8/69 - 5/72	Besuch des Albrecht-Dürer-Gymnasiums in Hagen
15.5.72	Abitur
10/72	Beginn des Studiums der Chemie an der Ruhr-Universität in Bochum
10/74	Diplom-Vorexamen
10/74 - 10/76	Grundstudium im Fach Biologie an der Ruhr-Universität
10/74 - 11/77	Hauptstudium und Diplom-Hauptexamen im Fach Chemie
12/78	Abschluß der Diplomarbeit
7/79	Diplom-Vorexamen im Fach Biologie
1/79 - 9/82	Durchführung der experimentellen Arbeiten für die vorliegende Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie I der Ruhr-Universität
seit 10/82	Zivildienst am Max-Planck-Institut für Systemphysiologie in Dortmund; Direktor: Professor Dr. D.W. Lübbers